

Université de Montréal

**La régulation transcriptionnelle de *Neurologine-1* par les facteurs de
transcription de l'horloge**

par Lydia Hannou

Programme de sciences biomédicales, option sciences psychiatriques.

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de
maîtrise en sciences biomédicales option sciences psychiatriques

Décembre 2017

© Lydia Hannou, 2017

Résumé

La molécule d'adhésion post-synaptique Neuroligine-1 (NLGN1) joue un rôle important dans la transmission glutamatergique et la plasticité synaptique. Localisée aux synapses excitatrices, elle régule le nombre de récepteurs glutamatergiques N-méthyl-D-aspartate (NMDA) fonctionnels, en plus d'avoir une implication dans la synaptogenèse et dans les processus d'éveil et de sommeil. Il a été montré que les facteurs de transcription CLOCK et BMAL1 se lient au promoteur du gène *Nlgn1* dans le cortex cérébral chez la souris, ce qui suggère une possible régulation transcriptionnelle de leur part. Pour mon projet de maîtrise, nos objectifs consistent à vérifier si les protéines de l'horloge CLOCK et BMAL1, ainsi que leurs homologues NPAS2 et BMAL2, régulent la transcription de *Nlgn1* via des essais luciférase *in vitro*; et à vérifier *in vivo* l'expression d'ARN messenger et de protéine NLGN1 chez des souris *Clock* mutantes. Nos résultats *in vitro* révèlent une activation transcriptionnelle de *Nlgn1* par l'hétérodimère CLOCK/BMAL1, ainsi que par des combinaisons avec leurs homologues NPAS2 et BMAL2. Cette activation observée est cependant réprimée lors de l'ajout de la kinase GSK3 β . *In vivo*, les niveaux d'ARN messenger des variants transcriptionnels de *Nlgn1* avec ou sans insert A sont significativement diminués chez les souris *Clock* mutantes, alors que pour les variants avec ou sans insert B, le rythme d'expression d'ARN est inversé. Aucun changement des niveaux de protéine NLGN1 n'a été observé. Ces résultats nous permettent d'approfondir notre compréhension de la régulation de NLGN1 *in vitro* et au niveau de l'organisme.

Mots-clés : Neuroligine-1, transcription, protéines de l'horloge, essai luciférase, expression génique, souris.

Abstract

The post-synaptic adhesion molecule Neuroligin-1 (NLGN1) plays an important role in glutamatergic transmission and synaptic plasticity. Localized mainly at excitatory synapses, it regulates the number of functional N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamatergic receptors, in addition to being involved in synaptogenesis and in the regulation of wakefulness and sleep. It has been shown that the transcriptional factors CLOCK and BMAL1 bind to the promoter of *Nlgn1* gene in the mouse cerebral cortex, suggesting a possible implication in its transcriptional regulation. For my master project, our objectives are to test if CLOCK and BMAL1, as well as their homologs NPAS2 and BMAL2, regulate the transcription of *Nlgn1* via *in vitro* luciferase assays; and to verify *in vivo* the levels of *Nlgn1* mRNA and NLGN1 protein in *Clock* mutant mice. Our *in vitro* results revealed a transcriptional activation of *Nlgn1* by the CLOCK/BMAL1 heterodimer, as well as combinations with their homologs NPAS2 and BMAL2. This observed activation is however repressed when adding the GSK3 β kinase. *In vivo*, levels of *Nlgn1* mRNA transcript variants with or without insert A were significantly decreased in *Clock* mutant mice, whereas for variants with or without insert B, mRNA expression rhythm was inverted. No change in NLGN1 protein levels was observed. These results increase our understanding about NLGN1 regulation *in vitro* and at the organism level.

Keywords : Neuroligin-1, transcription, clock proteins, luciferase assay, gene expression, mice.

Table des matières

Résumé en français.....	i
Mots clés en français.....	ii
Résumé et mots clés en anglais.....	iii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations.....	xi
Dédicace	xvii
Remerciements	xviii
 Chapitre 1 : Introduction	 1
1.1. La Neuroligine-1	2
1.1.1. Système Neuroligines-Neurexines : protéine Neuroligine-1 et ses partenaires.....	2
1.1.2. Les différents variants de <i>Neuroligine-1</i> et leurs rôles.....	4
1.1.3. Neuroligine-1 et ses rôles synaptiques : la transmission glutamatergique	4
1.1.4. Neuroligine-1 et ses rôles synaptiques : la synaptogénèse	7

1.1.5. Autre rôle de la Neuroligine-1 : le sommeil	8
1.1.6. Régulation de l'expression de <i>Neuroligine-1</i>	9
1.1.7. Les E-boxes et la régulation par les facteurs de transcription	11
1.2. Les protéines de l'horloge.....	12
1.2.1. CLOCK et BMAL1 : implication dans les rythmes circadiens.....	12
1.2.2. Les boucles de rétroaction.....	13
1.2.3. Les homologues NPAS2 et BMAL2	16
1.2.4. Rôle des protéines de l'horloge dans l'expression d'éléments synaptiques.....	18
1.3. La protéine GSK3 β	19
1.3.1. Propriétés de GSK3 β	19
1.3.2. Rôles de GSK3 β	20
1.3.3. Implication de GSK3 β dans la régulation post-traductionnelle des protéines de l'horloge.....	22

Chapitre 2 : Objectifs, hypothèses, et contributions spécifiques

2.1. Objectifs	24
2.2. Hypothèses	24
2.3. Contributions spécifiques de l'auteure principale	26

Préambule au Chapitre 3 : Contributions des co-auteurs à l'article	27
Chapitre 3 : Méthodologie et Résultats - Article de recherche	
Regulation of the <i>Neuroigin-1</i> Gene by Clock Transcription Factors	29
Chapitre 4 : Discussion	
4.1. Résumé des résultats.....	74
4.2. Régulation de <i>Neuroligine-1</i> par CLOCK et BMAL1	74
4.3. Régulation de <i>Neuroligine-1</i> par NPAS2 et BMAL2	77
4.4. Effet de GSK3 β sur la régulation de <i>Neuroligine-1</i>	80
4.5. Effet des mutations des E-boxes sur l'expression de <i>Neuroligine-1</i>	83
4.6. Effet de CLOCK mutante sur les niveaux d'ARN messenger <i>Neuroligine-1</i>	87
4.7. Effet de CLOCK mutante sur les niveaux de protéine Neuroligine-1	90
4.8. Limites et perspectives	92
4.9. Conclusion	95
Bibliographie.....	96

Annexe

Permission de reproduction de la figure 1	116
Permission de reproduction de la figure 2	117

Liste des tableaux

Chapitre 3 : Méthodologie et Résultats - Article de recherche

1. Primer and probe sequences used for PCR and qPCR.....	68
--	----

Liste des figures

Chapitre 1 : Introduction

1. Schéma du gène *Nlgn1* chez la souris, le rat, et l'humain montrant les positions des E-boxes par rapport au site d'initiation de la transcription 12
2. Modèle des boucles de rétroaction transcriptionnelle-traductionnelle de l'horloge 15

Chapitre 3 : Méthodologie et Résultats - Article de recherche

1. Transcriptional activation of *Nlgn1* by core clock components. (A) Scheme of the region of the *Nlgn1* gene selected for luciferase assay. (B) Transcriptional activation by the heterodimer CLOCK/BMAL1 via the *Nlgn1* and *Per1* gene fragments, and the empty pGL3 vector. (C) Transcriptional activation by CLOCK, BMAL1, and their homologs NPAS2 and BMAL2 via the *Nlgn1* gene fragment. (D) Fold induction of the transcriptional activation of *Nlgn1* with and without mutated E-boxes 69
2. Transcriptional activation of *Nlgn1* and *Nlgn2* by core clock components. (A) Scheme of the region of the *Nlgn2* gene cloned for luciferase assay. (B) Transcriptional activation by the heterodimer CLOCK/BMAL1 via the *Nlgn1* and *Nlgn2* gene fragments, and the empty pGL2 vector 70

3. Modulatory role of GSK3 β on transcriptional activation of *Nlgn1*. (A) Fold induction of the transcriptional activation of the *Nlgn1* gene fragment by CLOCK and BMAL1, with and without wild-type GSK3 β (GSK3 β WT) or constitutively active GSK3 β (GSK3 β S9A). (B) Fold induction of the transcriptional activation of *Nlgn1* gene fragment with CLOCK, BMAL1, GSK3 β WT and GSK3 β S9A exposed to the vehicle PBS or two concentrations of the GSK3 β inhibitor TDZD-8..... 71

4. *Nlgn1* mRNA in *Clock* mutant mice. (A) Schematic view of the position of qPCR amplicons on the *Nlgn1* mRNA for targeting different transcript variants. (B) Relative expression of *Nlgn1* transcripts in the right forebrain of *Clock* $\Delta 19/\Delta 19$ mutant mice and WT littermates. (C) Relative expression of *Per2* in the right forebrain of *Clock* $\Delta 19/\Delta 19$ mutant mice and WT littermates 72

5. NLGN1 protein level in *Clock* mutant mice. (A) Representative Western blot showing NLGN1 in the left forebrain of *Clock* $\Delta 19/\Delta 19$ mutant mice and WT littermates. (B) Quantification of Western blots for NLGN1 in forebrain of *Clock* $\Delta 19/\Delta 19$ mutant mice and WT littermates 73

Liste des abréviations

α : alpha

β : bêta

γ : gamma

μg : microgram

μl : microliter

μM : micromolar

A β : amyloïde-bêta

ADN, DNA : acide désoxyribonucléique

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

ANOVAs : analyses of variance

ARNm, mRNA : acide ribonucléique messenger

Arntl : aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1

ATP : adénosine triphosphate

bHLH : basic Helix-Loop-Helix

Bmal1, BMAL1 : brain and muscle Arnt-like protein-1

Bmal2, BMAL2 : brain and muscle Arnt-like protein-2

bp : base pair

$^{\circ}\text{C}$: Celsius degrees

C. elegans : Caenorhabditis elegans

C-terminal : carboxy-terminal

Ccg : Clock-controlled genes

cDNA : complementary DNA

CK1 : casein kinase 1

Clock, CLOCK : circadian locomotor output cycles kaput

Clock^{Δ19/Δ19} : délétion aux deux allèles de l'exon 19 du gène Clock

CO₂ : carbon dioxide

COS-7 : cells being CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material

Cry, CRY : cryptochrome

Cry1, CRY1 : cryptochrome-1

Cry2, CRY2 : cryptochrome-2

Dbp : D-Box binding PAR BZIP transcription factor

DMEM : Dulbecco's modified eagle's medium

DTT : dithiothreitol

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

Efn : ephrin

EfnA3 : ephrin A3

EfnB2 : ephrin B2

EphA4 : ephrin type-A receptor 4

EPSCs : excitatory postsynaptic currents

g : G-force

GABA : gamma-aminobutyric acid

GluN1 : glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1

GluR1 : glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1

GluR2 : glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2

GSK3 : glycogen synthase kinase 3

GSK3 α : glycogen synthase kinase 3 alpha

GSK3 β : glycogen synthase kinase 3 bêta

GusB : beta-glucuronidase

h : hour

HDAC2 : histone deacetylase 2

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HIF : hypoxia inducible factors

IGEPAL : octylphenoxypolyethoxyethanol

IRS-1 : insulin receptor substrate 1

Jrk, Clk, dClock : gène Clock chez la drosophile

kB : kilobase

KCl : potassium chloride

kD : kilodalton

KO : knock-out

LacZ : lactose Z

LD : light/dark

M : molar

MeCP2 : methyl-CpG-binding protein 2

Mg/ml : milligram per milliliter

MgCl₂ : magnesium chloride

MgSO₄ : magnesium sulfate

MgSO₄.7H₂O : magnesium sulfate heptahydrate

min : minute

mM : millimolar

mut : mutant

Myc : Myc proto-oncogene bHLH transcription factor

n : number

N-terminal : amino-terminal

Na₂CO₃ : sodium carbonate

Na₂HPO₄.7H₂O : sodium monohydrogen phosphate heptahydrate

NaH₂PO₄.H₂O : sodium dihydrogen phosphate monohydrate

nd : second

nm : nanometer

ng : nanogram

Nlgn3, NLGN3 : neuroligine-3

Nlgn1, NLGN1 : neuroligine-1

Nlgn1A, NLGN1A : neuroligine-1 avec insert A

Nlgn1AB, NLGN1AB : neuroligine-1 avec insert A et B

Nlgn1B, NLGN1B : neuroligine-1 avec insert B

Nlgn1NA : neuroligine-1 sans insert A

Nlgn1NB : neuroligine-1 sans insert B

Nlgn2, NLGN2 : neuroligine-2

Nlgn3, NLGN3 : neuroligine-3

Nlgn4, NLGN4 : neuroligine-4

NLGN4Y : neuroligine-4Y

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NMDAR : N-methyl-D-aspartate receptor

Npas2, NPAS2 : Neuronal PAS domain 2 protein

Nrf : nuclear factor E2-related factor

NRXNs : neurexines

Nrxn1, NRXN1 : neurexine-1

NRXN2 : neurexine-2

NRXN3 : neurexine-3

Nrxn- α , NRXN- α : neurexine alpha

Nrxn- β , NRXN- β : neurexine bêta

NSC : noyau suprachiasmatique

ONPG : 2-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside

PAS : period-arnt-sim

PBS : phosphate buffered saline

PBS-T : phosphate buffered saline-Tween

PCR : polymerase chain reaction

PDZ : postsynaptic density-disc large-zona occludens

Per, PER : period

Per1 : period-1

Per2, PER2 : period-2

Per3 : period-3

PLT : potentialisation à long-terme

PSD-95 : postsynaptic density protein 95

qPCR : quantitative PCR

RIPA : radioimmunoprecipitation assay

ROR : retinoic acid receptor-related orphan receptor

Rora : retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha

Rory : retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma

ROREs, RRE : retinoic acid-related orphan receptor response elements

Rps9 : ribosomal protein S9

S-SCAM : synaptic scaffolding molecule

S9A : serine mutée par une alanine

SDS : sodium dodecylsulphate

sec : second

SKN-1 : skinhead-1

st : first

T-test : student test

Tau : tubulin-associated unit

Tbp : TATA-box binding protein

TCF4 : transcription factor 4

TDZD-8 : 4-benzyl-2-methyl-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione

TIM : timeless

V : volt

WT : wild-type

Zfper4 : zebrafish period 4

ZT : zeitgeber time

À mes parents,

Salima Chabib et Mabrouk Hannou

et à Marie-Eve Huchette

Merci pour tout...

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier chaleureusement ma directrice de recherche, Dre Valérie Mongrain, pour m'avoir donné la chance de travailler dans son laboratoire depuis quatre ans maintenant. Malgré mon questionnement concernant la poursuite de mes études aux cycles supérieurs, elle a su me rassurer et répondre à mes questions, et m'a offert un poste d'étudiante à la maîtrise. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir permis d'accomplir ce défi dont je suis très fière aujourd'hui. J'ai appris énormément durant tout mon parcours et développé beaucoup d'aptitudes, en plus de ma confiance en moi. Merci pour ton écoute, ta patience, ta disponibilité, et ton accessibilité à discuter de tout et n'importe quoi! Travailler dans ce laboratoire, avec une équipe d'enfer, et un environnement de travail très stimulant et amusant est une expérience mémorable! Du fond du cœur, merci pour tout.

Un merci particulier à Erika Bélanger-Nelson, qui a été ma superviseure durant mon stage au baccalauréat et qui, depuis, m'a suivie tout au long de mon parcours jusqu'au début de ma maîtrise. Merci pour m'avoir transmis tes connaissances et d'avoir toujours égayé mes journées avec ta bonne humeur contagieuse!

Merci à toute l'équipe du laboratoire Mongrain, étudiants comme stagiaires, que j'ai côtoyés durant mon parcours. Je n'aurais pas pu trouver une meilleure équipe! Une mention spéciale à Marlène Freyburger, Bong Soo Seok, Chloé Provost, Emma O'Callaghan, Julien Dufort-Gervais, Maria Neus Ballester Roig, Pierre-Gabriel Roy, Cassandra Charbonneau Areal, et Nicolas Lemmetti pour tous les moments de

rire, les «lab events», et notre passion commune pour la bouffe! J'en garde des souvenirs fantastiques!

Je remercie tous les membres du centre de recherche, et particulièrement Mélanie Welman, qui a toujours trouvé le temps de m'aider et de me guider pour mes mille et une questions! Je n'y serai pas arrivée aussi facilement sans ta présence et ton savoir légendaire!

Je tiens aussi à remercier une personne bien spéciale qui m'a toujours accompagnée au travers de cette aventure et bien plus. Marie-Eve Huchette, merci pour ton support et les quantités astronomiques de Ferrero Rocher que tu m'as fait ingérer! Merci d'avoir été patiente et de m'avoir toujours encouragée dans les moments où j'en avais besoin. Tes petits plats ont fait toute la différence!

Finalement, un grand merci à mes parents, Salima Chabib et Mabrouk Hannou, qui m'ont toujours poussée à aller plus loin. Merci pour votre soutien et pour avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. La recherche a toujours été un domaine fascinant pour mon père, qui est lui-même un bien brillant et curieux savant! À ma sœur, Lina-Manel Hannou, qui j'espère avoir inspirée à poursuivre ses objectifs, et à toujours aller de l'avant. Dans la vie, tu peux te rendre aussi loin que tu le veux, il suffit de le vouloir et de foncer!

Chapitre 1 : Introduction

L'être humain ainsi que l'animal vivent au rythme d'un cycle perpétuel; celui du jour et de la nuit, à travers les différentes saisons de l'année. Dans une journée de 24 heures, l'être vivant, diurne ou nocturne, accomplit plusieurs activités qui sont propices à certains moments de la journée : chasser, manger, copuler, faire ses besoins, dormir, etc. Ces comportements sont régulés par des rythmes endogènes qui ont évolués à partir du cycle lumière/obscurité de la nature; ils sont appelés les rythmes circadiens (Rusak et Zucker, 1975). Ces rythmes circadiens ont une durée d'environ 24 heures et sont générés par une horloge biologique centrale, située dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus chez les mammifères, ainsi que des horloges secondaires situées dans les tissus périphériques (Ko et Takahashi, 2006; Guilding et Piggins, 2007).

Chaque cellule de l'organisme possède une horloge autonome, qui ensemble se synchronisent toutes pour produire une panoplie de rythmes physiologiques : sécrétions hormonales (cortisone, mélatonine, prolactine, etc), température corporelle, ovulation, cycle d'éveil-sommeil, etc (Weitzman, 1976; Dijk et Czeisler, 1994; Weibel et al., 1997; de la Iglesia et Schwartz, 2006). Des perturbations dans les rythmes circadiens peuvent engendrer plusieurs problèmes de santé, tels que des problèmes de sommeil, une accélération du développement du diabète de type 2, des troubles de l'humeur, des problèmes de performances cognitives, ou encore des perturbations endocriennes, entre autres (Weibel et Brandenberger, 1998; Grandin et al., 2006; Wright et al., 2006; Tompkins, 2011; Gale et al., 2011). Il est donc

primordial de comprendre la régulation de ces rythmes au niveau moléculaire, afin de cerner les gènes impliqués et d'utiliser ces connaissances dans le traitement de troubles psychiatriques et dans l'amélioration de la qualité de vie.

En ce sens, l'étude de mon mémoire porte sur la régulation transcriptionnelle d'un potentiel gène contrôlé par l'horloge, *Neuroligine-1*. Ce gène produit une protéine d'adhésion postsynaptique impliquée dans la plasticité synaptique et associée à différentes caractéristiques du sommeil, et à certains troubles psychiatriques. Les prochaines sections de l'introduction présenteront les rôles de la Neuroligine-1, ses partenaires synaptiques, ainsi que les variants transcriptionnels du gène. Il sera aussi question de la relation entre les facteurs de transcription de l'horloge, leur régulation, et l'expression de *Neuroligine-1*.

1.1 La Neuroligine-1

1.1.1 Système Neuroligines-Neurexines : protéine Neuroligine-1 et ses partenaires

La famille des Neuroligines (NLGNs) comprend quatre membres chez les rongeurs (NLGN1, -2, -3, et -4) et cinq membres chez l'humain (NLGN1, -2, -3, -4, et -4Y) (Araç et al., 2007; Baudouin et Scheiffele, 2010). C'est une famille de protéines postsynaptiques qui se lie aux membres de la famille présynaptique des Neurexines (NRXNs) pour former un complexe trans-synaptique et médier ainsi l'adhésion cellulaire (Song et al., 1999; Araç et al., 2007; Cheyne et Lohmann, 2014). Tout comme les NLGNs, plusieurs membres composent la famille des NRXNs : NRXN1, -2, et -3, et chacun de leur gène produit deux transcrits, soit *Nrxn-α* et *Nrxn-*

β (Baudouin et Scheiffele, 2010). Neuroligine-1 (NLGN1), qui est exprimée dans tout le cerveau et plus particulièrement dans le cortex cérébral et l'hippocampe, est majoritairement localisée au niveau des synapses glutamatergiques dites excitatrices (Song et al., 1999). Elle possède un large domaine extracellulaire N-terminal homologue aux sérines estérases mais sans activité enzymatique, une seule hélice transmembranaire, et une courte portion cytoplasmique C-terminale (Song et al., 1999; Araç et al., 2007). Aux synapses excitatrices, la NLGN1 se lie seulement à certaines formes de NRXN- β ; elle peut toutefois interagir avec les autres variants de NRXN- β sans les lier (Ichtchenko et al., 1995; Ichtchenko et al., 1996). L'interaction du système NLGN1/NRXN- β se fait de manière calcium-dépendante via le domaine extracellulaire N-terminal de NLGN1 (Nguyen et Südhof, 1997; Araç et al., 2007), alors que la portion C-terminale permet le recrutement d'importantes protéines en intracellulaire telles que S-SCAM (Synaptic SCAffolding Molecule) et PSD-95 (PostSynaptic Density protein 95) via un motif PDZ (Postsynaptic density-Disc large-Zona occludens) (Irie et al., 1997; Hirao et al., 1998; Song et al., 1999). S-SCAM et PSD-95, qui sont des protéines d'échafaudage, d'assemblage et d'organisation protéique au niveau postsynaptique, ont la capacité d'initier une cascade de recrutement de plusieurs éléments impliqués dans la plasticité structurelle et fonctionnelle de la synapse (Irie et al., 1997; Hirao et al., 1998).

1.1.2 Les différents variants de Neuroligine-1 et leurs rôles

Suite à la transcription de son gène, *Nlgn1* subit un épissage alternatif qui génère plusieurs transcrits différents. Ces transcrits sont caractérisés par la présence ou l'absence de deux inserts, soit l'insert A et l'insert B (Ichtchenko et al., 1995; Chih et al., 2006). Nous retrouvons donc dans le système nerveux central quatre isoformes de la protéine NLGN1 contenant 1) les deux inserts A et B (NLGN1AB), 2) aucun des deux inserts, 3) uniquement l'insert A (NLGN1A), et 4) uniquement l'insert B (NLGN1B) (Chih et al., 2006). La différence connue dans le rôle de ces deux inserts semble être la localisation synaptique de NLGN1 : l'insert A serait responsable d'une localisation aux synapses inhibitrices GABAergiques (en l'absence d'insert B), alors que l'insert B mènerait plutôt à une localisation aux synapses excitatrices glutamatergiques (Chih et al., 2006). Cette spécialisation pourrait être due à la structure carbohydate de l'insert B qui empêcherait NLGN1 d'induire la formation de synapses inhibitrices GABAergiques (Chih et al., 2006). Aussi, par rapport aux autres isoformes, l'absence de l'insert B mènerait à plus d'interaction avec les protéines NRXN- α (Boucard et al., 2005). En somme, la localisation et les fonctions synaptiques de NLGN1 dépendent de son type d'isoforme.

1.1.3 Neuroligine-1 et ses rôles synaptiques : la transmission glutamatergique

De par sa localisation aux synapses excitatrices, NLGN1 joue un rôle clé dans la transmission glutamatergique. Tel que mentionné à la section précédente, NLGN1 interagit avec NRXN- β et mobilise des protéines d'échafaudage pour initier une

cascade de recrutement d'éléments impliqués dans la plasticité synaptique (Nguyen et Südhof, 1997; Irie et al., 1997; Hirao et al., 1998). Parmi ces éléments, nous retrouvons deux récepteurs à canaux ioniques, AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) et NMDA (N-methyl-D-aspartate) (Lissin et al., 1998; Song et al., 1999; Kim et Sheng, 2004). Il a été montré que NLGN1 est essentielle au recrutement des récepteurs NMDA fonctionnels aux synapses glutamatergiques. En effet, NLGN1 détermine le nombre de récepteurs NMDA et est primordiale pour la plasticité synaptique dépendante de ces récepteurs (Kim et al., 2008; Wittenmeyer et al., 2009; Jung et al., 2010). Le recrutement de ces récepteurs se ferait via leur sous-unité GluN1 qui interagit avec le domaine extracellulaire cholinestérase de NLGN1 (Budreck et al., 2013). Aussi, NLGN1 est requise pour l'expression normale des courants EPSCs (excitatory postsynaptic currents) dépendants des récepteurs NMDA. Plusieurs études ont effectivement montré qu'il y a une diminution de l'amplitude de ces courants chez des souris *Nlgn1* knock-out (KO) (Chubykin et al., 2007; Jung et al., 2010; Soler-Llavina et al., 2011), et que la réintroduction de NLGN1 dans des neurones de souris *Nlgn1* KO restaure cette perte d'amplitude (Budreck et al., 2013). En ce qui concerne les récepteurs AMPA, leur recrutement se fait via leurs sous-unités GluR1 ou GluR2 suite à la formation du complexe NRXN/NLGN, et leur immobilisation aux synapses nécessite l'interaction de NLGN1 avec PSD-95 (Bang et Owczarek, 2013; Mondin et al., 2011). Lorsque NLGN1 est exprimée sans les quatre derniers aminoacides de son domaine C-terminal, l'empêchant ainsi de lier PSD-95, une diminution des récepteurs AMPA à sous-unité GluR2 est observée aux synapses, ainsi qu'une diminution de l'amplitude des courants EPSCs dépendants de

ces récepteurs (Nam et Cheng, 2005). Chez des souris *Nlgn1* KO, une diminution de fréquence et d'amplitude de 54% et 13%, respectivement, des courants EPSCs dépendants des récepteurs AMPA est observée dans des cellules pyramidales CA1 d'hippocampe (Mondin et al., 2011). Aussi, Schnell et collaborateurs en 2012 ont noté une augmentation des courants dépendants des récepteurs AMPA relativement aux courants dépendants des récepteurs NMDA (ratio AMPA/NMDA) lorsque *Nlgn1* est surexprimée dans des cellules granulaires de souris (Schnell et al., 2012). En somme, ces données suggèrent un rôle de NLGN1 au niveau des récepteurs NMDA et AMPA.

Les récepteurs NMDA et AMPA sont impliqués dans la modulation de la force de la synapse glutamatergique. Plus spécifiquement, de nombreuses études supportent une implication nécessaire de ces récepteurs dans l'établissement de la potentialisation à long-terme (PLT), résultant en une augmentation à long terme de la transmission synaptique (Bliss et Collingridge, 1993; Malenka et Nicoll, 1999; Lu et al., 2001; Mion et al., 2006). Ce processus de PLT est impliqué dans l'apprentissage et la mémorisation (Maren, 1999; Stuchlik, 2014). Des études chez des souris *Nlgn1* KO, ou chez des souris dont l'expression de *Nlgn1* est diminuée, montrent des déficits dans la transmission synaptique médiée par les récepteurs NMDA, une abolition de la PLT aux connexions du thalamus et de l'amygdale, et un déficit de rétention de la mémoire associée à la peur (Kim et al., 2008, Jung et al., 2010). Blundell et collaborateurs en 2010 ont aussi montré *in vitro* que la délétion de *Nlgn1* chez des souris mène à une diminution de la magnitude de la PLT et un déficit de la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe (Blundell et al., 2010). Ainsi, NLGN1

joue un rôle clé dans la transmission glutamatergique, et par le fait même, un rôle important dans la consolidation de la mémoire et de l'apprentissage.

1.1.4 Neuroligine-1 et ses rôles synaptiques : la synaptogénèse

En plus de son rôle dans la transmission synaptique, NLGN1 serait aussi impliquée dans la synaptogénèse. En effet, des expériences *in vitro* sur des cellules non-neuronales montrent que NLGN1 mène à la formation de synapses (Scheiffele et al., 2000; Fu et al., 2003; Nam et Chen, 2005). Lorsque des cultures neuronales sont utilisées, le nombre de synapses excitatrices est proportionnel à l'expression de *Nlgn1*; sa surexpression augmente le nombre de synapses alors que son inhibition le diminue (Sara et al., 2005; Chih et al., 2005; Chubykin et al., 2007; Wittenmayer et al., 2009). Dans une étude *in vitro* utilisant des cellules hippocampiques granulaires adultes, la diminution de l'expression de *Nlgn1* réduit la densité et la complexité dendritique ainsi que la survie neuronale (Schnell et al., 2014). Par contre la transmission synaptique basale ne semble pas affectée (Schnell et al., 2014). Chez un modèle de souris triple mutant pour *Nlgn1*, *Nlgn2*, et *Nlgn3*, des expériences *in vivo* montrent que le nombre de synapses ainsi que leur structure ne sont pas affectés par l'absence des protéines, malgré la mort précoce des souris due à des problèmes respiratoires (Varoqueaux et al., 2006). NLGN1 semble pourtant bien avoir un rôle à jouer dans la formation et le nombre de synapses suivant les résultats des études *in vitro*. Dans le cas des expériences *in vivo*, les résultats contradictoires observés pourraient s'expliquer par la complexité de l'organisme vivant et par des

mécanismes compensatoires qui entreraient en action afin de combler la fonction des NLGNs au niveau de la synaptogenèse. Kwon et collaborateurs en 2012 proposent que l'effet synaptogénique de NLGN1 dépend du niveau d'expression de NLGN1 entre deux neurones voisins. Lorsque deux neurones adjacents expriment des niveaux similaires de NLGN1, que ça soit par la présence ou l'absence de NLGN1, il n'y a pas d'effet synaptogénique observé (Kwon et al., 2012). Toutefois, lorsque certains neurones adjacents expriment NLGN1 et d'autres non, il y a un effet synaptogénique observé pour les neurones exprimant NLGN1, alors que ceux qui ne l'expriment pas sont désavantagés (Kwon et al., 2012). NLGN1 semble donc jouer un rôle important dans les mécanismes synaptiques, telle la plasticité synaptique, qui régulent une multitude de fonctions, tel que le sommeil.

1.1.5 Autre rôle de la Neuroligine-1 : le sommeil

Le sommeil est important et plusieurs études montrent qu'il favorise les processus cognitifs et permet la consolidation de la mémoire et un meilleur apprentissage (Diekelmann et Born, 2010; Rasch et Born, 2013). Benington et Frank en 2003 ont produit une revue de littérature exhaustive sur les innombrables études établissant un lien entre le sommeil et la plasticité synaptique (Benington et Frank, 2003). Cette revue aborde les aspects de neurophysiologie cellulaire et des processus du sommeil et de l'éveil, ainsi que des mécanismes moléculaires et cellulaires de la plasticité synaptique et de leur lien avec le sommeil (Benington et Frank, 2003). Due à son implication dans la plasticité synaptique, NLGN1 pourrait

donc être impliquée dans la régulation du sommeil. Des études chez la souris montrent qu'une privation de sommeil diminue l'expression du gène *Nlgn1* au niveau du cortex cérébral (Wang et al., 2010), plus spécifiquement au niveau du transcrit *Nlgn1* avec insert B (El Helou et al., 2013). L'expression protéique de NLGN1 semble suivre le même schéma, soit une diminution des niveaux de protéine NLGN1 au niveau du prosencéphale antérieur, chez la souche de souris C57BL/6J (El Helou et al., 2013). Aussi, chez les souris mutantes pour *Nlgn1*, il y a une diminution de la durée du sommeil et une difficulté à maintenir l'état d'éveil (El Helou et al., 2013). Une altération des ondes lentes chez ces souris, caractérisée par une augmentation de l'amplitude, a aussi été observée après privation de sommeil, ce qui suggère un rôle de NLGN1 dans la synchronie neuronale en réponse à un manque de sommeil (Massart et al., 2014). De plus, une privation de sommeil affecte les mécanismes épigénétiques d'hydroxyméthylation de plusieurs gènes impliqués dans la plasticité synaptique tel que NLGN3 et les partenaires d'adhésion de NLGN1, les NRXNs (Massart et al., 2014). Finalement, des études chez des drosophiles mâles mutantes pour *Nrxn1* et *Nlgn4* ont montré que l'absence de ces deux protéines diminue la durée du sommeil et augmente sa fragmentation durant le jour pour NRXN et la nuit pour NLGN4 (Li et al., 2013; Larkin et al., 2015).

1.1.6 Régulation de l'expression de Neuroligine-1

Malgré l'importance de NLGN1 au niveau des fonctions synaptiques, très peu d'information est connue par rapport à sa régulation transcriptionnelle. Runkell et

collaborateur en 2013 ont montré que l'expression génique de *Nlgn1* est altérée chez des souris ne possédant pas la protéine MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2). Cette protéine est un facteur de transcription (ou de répression) qui se lie à des régions contenant des motifs CpG-méthylés, qui sont d'ailleurs retrouvés dans la séquence génomique des membres de la famille NLGN et NRXN (Runkell et al., 2013). Une autre étude impliquant MeCP2 a montré que lorsque des rats sont injectés avec des fibrilles d'amyloïde-beta, retrouvées dans la maladie d'Alzheimer, dans la zone hippocampique CA1, une diminution de l'expression du gène *Nlgn1* et de la protéine NLGN1 est observée (Bie et al., 2014). Cette diminution de l'expression est due à une augmentation de l'interaction entre l'enzyme HDAC2 (histone deacetylase 2) et MeCP2, qui mène à une suppression de l'acétylation des histones H3 et à une augmentation de la méthylation dans la région du promoteur de *Nlgn1*, menant à une répression de l'expression génique (Bie et al., 2014). Étant donné que l'absence d'expression de *Nlgn1* amène à des déficits d'apprentissage et de mémoire (Kim et al., 2008, Jung et al., 2010; Blundell et al., 2010), il n'est pas étonnant que NLGN1 puisse avoir une implication dans des maladies neurodégénératives impliquant des déficits de mémoire telle que la maladie d'Alzheimer. Finalement, Staab et collaborateurs en 2014 ont observé chez le modèle *C. elegans* un lien entre la régulation de l'expression de *Nlgn1* et le stress oxydatif. En effet, lorsqu'un stress oxydatif est induit par traitement pharmacologique, ou que la protéine SKN-1 (homologue à la famille Nrf (nuclear factor E2-related factor))- un facteur de transcription contrôlant la première réponse au stress oxydatif- est surexprimée, les niveaux de NLGN1 sont augmentés (Staab et al., 2014). Il a aussi

été observé que des niveaux élevés de *Nlgn1* corrélaient avec une augmentation de survie en réponse au stress oxydatif, alors que de faibles niveaux corrélaient avec une diminution de survie (Staab et al., 2014). De plus, quatre sites consensus de liaison à SKN-1 (AATGTCAT) ont été trouvés dans le promoteur de *Nlgn1*, dans les premières 500 pb précédant le site de départ de transcription. Cependant, SKN-1 ne lie pas ces sites de liaison lors de conditions non-stressantes (Staab et al., 2014), ce qui confirme son rôle de régulateur de l'expression de *Nlgn1* lors de conditions de stress seulement.

1.1.7 Les E-boxes et la régulation par les facteurs de transcription

D'autres sites de liaison sont retrouvés aussi dans le promoteur de *Nlgn1*. Ces sites sont appelés «E-box» et sont formés d'une séquence de six nucléotides CANNTG, où N est n'importe quel nucléotide parmi A, T, C, ou G (Massari et Murre, 2000). El Helou et collaborateurs en 2013 ont effectivement montré que dans le gène de *Nlgn1*, plusieurs E-boxes sont conservés à travers différentes espèces (humain, souris, et rat; voir figure 1). Les E-boxes sont connus pour être liés par des facteurs de transcription faisant partie de la famille des hélice-boucle-hélice (bHLH (basic Helix-Loop-Helix)) possédant un domaine PAS (*Period-Arnt-Sim*), permettant les interactions protéine-protéine (Massari et Murre, 2000; Ko et Takahashi, 2006; Henry et Crosson, 2011). Le domaine d'interaction bHLH est formé de deux hélices α amphipathiques séparées par une boucle d'acides aminés. La liaison à l'ADN requiert la dimérisation de deux partenaires bHLH-PAS, ainsi qu'une région riche en

aminoacides basiques. Cette région basique se situe à l'extrémité N-terminale de la première hélice α de chaque partenaire du dimère (Blancar et Rutter, 1992). Il existe une variété de protéines bHLH-PAS (Myc, HIF, TCF4, etc), et parmi cette vaste famille, nous retrouvons les protéines de l'horloge CLOCK et BMAL1 (Gekakis et al., 1998; Dardente et al., 2007). Il n'est toutefois pas encore connu si ces éléments E-boxes du gène *Nlgn1* contribuent à sa régulation transcriptionnelle.

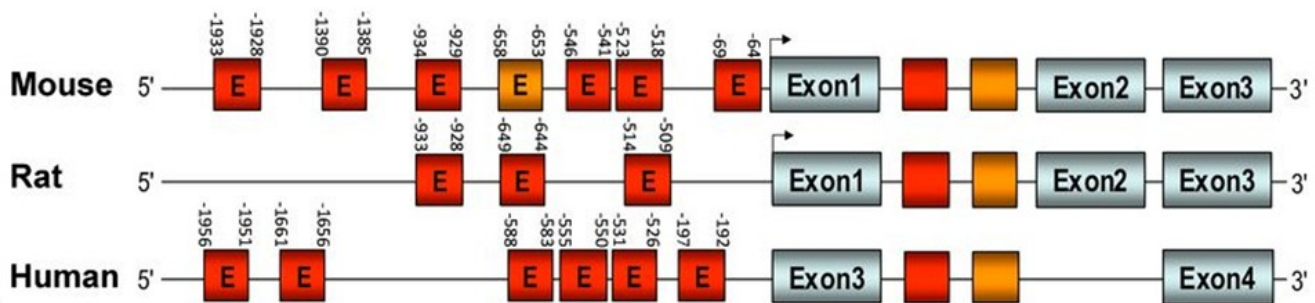


Figure 1 : Schéma du gène *Nlgn1* chez la souris, le rat, et l'humain montrant les positions des E-boxes par rapport au site d'initiation de la transcription (flèche noire). Les E-boxes rouges sont les séquences CANNTG et ceux orange représentent des E-boxes avec séquence consensus CACGTG (Figure reproduite de El Helou J, Bélanger-Nelson E, Freyburger M, Dorsaz S, Curie T, La Spada F, Gaudreault PO, Beaumont É, Pouliot P, Lesage F, Frank MG, Franken P, and Mongrain V (2013) Neuroligin-1 links neuronal activity to sleep-wake regulation. Proc Natl Acad Sci USA 110(24):9974-9979. Permission accordée par la revue scientifique PNAS).

1.2 Les protéines de l'horloge

1.2.1 CLOCK et BMAL1 : implication dans les rythmes circadiens

La protéine CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput) est un facteur de transcription de la famille bHLH-PAS, tel que décrit précédemment (Gekakis et al., 1998). Cette protéine est exprimée majoritairement dans le noyau suprachiasmatique

de l'hypothalamus (NSC), ainsi que dans les tissus périphériques, tel le cœur, le foie, et les muscles (Ko et Takahashi, 2006; Guilding et Piggins, 2007). Son principal partenaire de liaison est BMAL1 (brain and muscle Arnt-like protein-1; aussi connu comme aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 [Arntl]), membre de la famille bHLH-PAS, et exprimé aussi dans le NSC, selon le temps du jour, et dans les tissus périphériques (Ko et Takahashi, 2006; Guilding et Piggins, 2007). Ces deux protéines sont appelées protéines de l'horloge car elles participent à la régulation des rythmes circadiens, qui sont impliqués dans le comportement, la physiologie, et l'homéostasie de l'organisme (Ko et Takahashi, 2006; Guilding et Piggins, 2007). Chez les mammifères, les rythmes circadiens tels ceux de la température corporelle, les sécrétions urinaires, etc. (Aschoff, 1965), ayant évolués à partir du cycle de lumière-obscurité d'environ 24 heures, sont générés par l'horloge biologique principale située au niveau des NSC de l'hypothalamus. Cette horloge coordonne aussi d'autres horloges dites périphériques situées dans la majorité des tissus, afin d'assurer un rythme global à travers tout l'organisme (Ko et Takahashi, 2006; Guilding et Piggins, 2007).

1.2.2 Les boucles de rétroaction

Au niveau moléculaire, la régulation du cycle circadien de 24 heures se traduit par une série de boucles de rétroaction positives et négatives (voir figure 2). La première boucle est constituée de CLOCK et BMAL1 qui dimérisent pour former un complexe qui se lie aux E-boxes des gènes cibles, dont les gènes de l'horloge *Period*

(*Per1*, -2, et -3) et *Cryptochrome* (*Cry1* et -2). L'expression de ces gènes mène à la formation d'un complexe multiprotéique, incluant PER et CRY, qui se transloquent au noyau pour interagir avec le complexe CLOCK/BMAL1 et réprimer ainsi leur propre expression (Ko et Takahashi, 2006; Sato et al., 2006). CLOCK et BMAL1 ciblent aussi les gènes des récepteurs nucléaires orphelins *Rora* et *Rev-erba* (Ko et Takahashi, 2006), dont l'expression mène à deux autres boucles. Les protéines ROR (α , β , et γ) et REV-ERB (α et β) compétitionnent pour lier des séquences ROREs (retinoic acid-related orphan receptor response elements) qui se trouvent, entre autres, dans la région du promoteur du gène *Bmal1* (Guillaumond et al., 2005; Ko et Takahashi, 2006). Lorsque ROR lie *Bmal1*, une activation de sa transcription s'en suit (Mongrain et al., 2008). Si c'est plutôt REV-ERB qui le lie, la répression de sa transcription s'enclenche (Guillaumond et al., 2005; Ko et Takahashi, 2006).

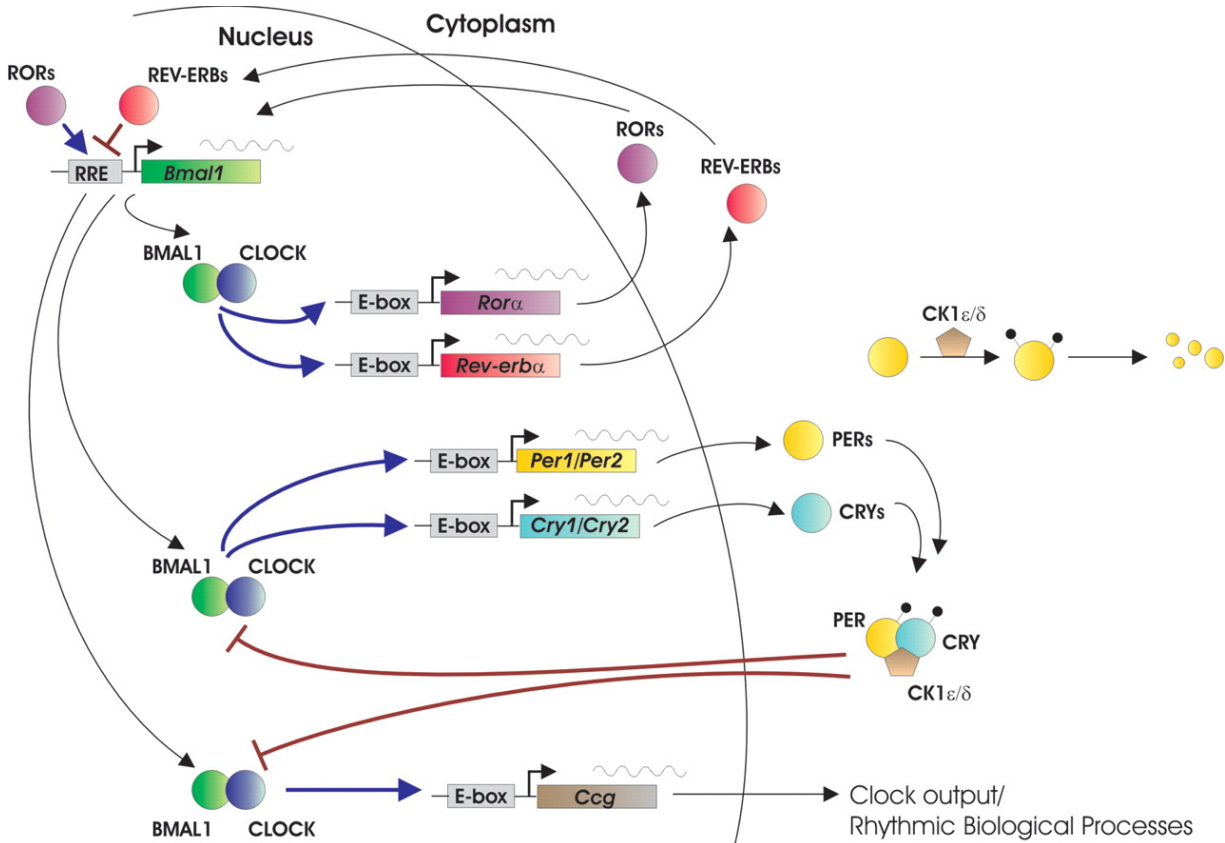


Figure 2 : Modèle des boucles de rétroaction transcriptionnelle-traductionnelle de l'horloge. Première boucle : Les protéines CLOCK et BMAL1 forment un dimère et transcrivent les gènes *Per* et *Cry* qui produisent les protéines PERs et CRYs. PERs et CRYs forment un complexe multiprotéique avec CK1s (Casein Kinase 1) et interagissent avec le dimère CLOCK/BMAL1. Cette interaction réprime l'expression de *Per* et *Cry* ainsi que celle des gènes contrôlés par les facteurs de l'horloge (*Ccg*). Deuxième boucle : Le dimère CLOCK/BMAL1 transcrit les gènes *Rora* et *Rev-erba* qui produisent les protéines RORs et REV-ERBs. Ces deux protéines compétitionnent pour lier des séquences RRE (retinoic acid-related orphan receptor response elements) dans le promoteur du gène *Bmal1*. RORs activent la transcription de *Bmal1*, alors que REV-ERBs l'inhibent. (Figure reproduite de Ko CH and Takahashi JS (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. Hum Mol Genet 15 Spec No 2:R271-R277. Permission accordée par le journal scientifique Oxford University Press).

1.2.3 Les homologues NPAS2 et BMAL2

D'autres protéines de l'horloge, faisant aussi partie de la famille des bHLH-PAS, peuvent aussi dimériser avec les facteurs CLOCK ou BMAL1 et induire la transcription de gènes cibles via les E-boxes. Le plus proche homologue de CLOCK, NPAS2 (Neuronal PAS domain 2 protein), est exprimé dans le prosencéphale (cerveau antérieur) et, comme CLOCK, lie son partenaire BMAL1 pour former un dimère (Garcia et al., 2000). Des études chez des souris portant une mutation dominant-négative aux deux allèles du gène *Clock*, et produisant ainsi une protéine non-fonctionnelle, montrent que la durée du cycle circadien est beaucoup plus longue (26-28 heures) que chez les souris non-mutantes (~ 24 heures), et lorsque ces souris sont en constante exposition à la noirceur, le cycle circadien allongé perd sa rythmicité (Vitaterna et al., 1994; Ko et Takahashi, 2006). De plus, cette mutation de la protéine CLOCK mène à une perte de fonction du dimère CLOCK/BMAL1, qui peut toujours lier ses gènes cibles sans pouvoir les transcrire (Gekakis et al., 1998; Jin et al., 1999; Ko et Takahashi, 2006). Ces données montrent l'importance que joue CLOCK au sein du mécanisme moléculaire des rythmes circadiens. Cependant, les résultats d'études menées par DeBruyne et collaborateurs en 2006 et 2007 montrent que chez des souris déficientes en protéine CLOCK (KO), le rythme de l'activité locomotrice n'est pas perturbé et le cycle de transcription de certains gènes de l'horloge continue à avoir lieu, bien qu'un peu perturbé (DeBruyne et al., 2006). C'est lorsque les souris sont déficientes des deux protéines CLOCK et NPAS2 qu'il y a une abolition complète de rythmicité dans l'activité locomotrice et une perturbation de

l'expression des gènes de l'horloge (DeBruyne et al., 2007); suggérant fortement une fonction compensatrice de NPAS2 en l'absence de CLOCK.

Pour sa part, l'homologue de BMAL1, BMAL2 (Brain-Muscle-Arnt-Like-protein 2), interagit avec CLOCK ou encore NPAS2 pour former un hétérodimère (Shi et al., 2010). Mais contrairement à NPAS2, BMAL2 ne semble pas avoir un grand rôle compensateur pour les fonctions de BMAL1. En effet, Bunger et collaborateurs en 2000 ont montré, chez des souris ayant une mutation aux deux allèles du gène *Bmal1* (KO), une perte de rythmes circadiens au niveau de l'activité locomotrice en constante noirceur (Bunger et al., 2000). De plus, ces souris affichaient une altération dans l'activité locomotrice durant des cycles normaux de lumière-noirceur, et une diminution des niveaux d'activité en général. Au niveau moléculaire, ces souris exprimaient des niveaux très bas et non-rythmiques de gènes de l'horloge mesurés, *Per1* et *Per2* (Bunger et al., 2000). Dans une autre étude, des cellules fibroblastes de souris mutantes pour *Bmal1*, n'exprimant aucune rythmicité, ont été utilisées pour étudier l'effet de l'expression de *Bmal2*. Aucune restauration de la rythmicité n'a été observée, et des niveaux d'expression bas de *Per2* et *Rev-erba* ont été mesurés (Xu et al., 2015). Suite à des essais avec des chimères BMAL1-BMAL2, les auteurs expliquent ce manque de restauration de la rythmicité circadienne par le fait que BMAL2 ne posséderait pas un signal de localisation nucléaire, contrairement à BMAL1 (Xu et al., 2015). Finalement, contrairement aux autres données, Shi et collaborateurs en 2010 montrent que surexprimer constitutivement *Bmal2* chez des souris mutantes pour *Bmal1* restaure partiellement la rythmicité circadienne, ainsi que l'activité locomotrice. Par contre cette restauration est moins efficace lorsque les tests

sont faits *in vitro*, dans des tissus spécifiques de ces souris mutantes (Shi et al., 2010).

1.2.4 Rôle des protéines de l'horloge dans l'expression d'éléments synaptiques

Les protéines de l'horloge jouent donc un rôle crucial dans le maintien des rythmes circadiens. Leur régulation transcriptionnelle des gènes cibles requiert la liaison à des E-boxes CANNTG (Massari et Murre, 2000; Ko et Takahashi, 2006). El Helou et collaborateurs en 2013 ont montré que le promoteur du gène *Nlgn1* possède des E-boxes, conservés à travers différentes espèces comme souligné plus haut (section 1.1.7). Ils ont aussi montré que CLOCK et BMAL1 lient, d'une manière dépendante du temps du jour, une séquence contenant un E-box consensus CACGTG retrouvé dans le promoteur du gène *Nlgn1* au niveau du cortex cérébral de souris; et que suite à une privation de sommeil, il y a détachement des facteurs de transcription de cette séquence et diminution des niveaux d'expression de *Nlgn1* (El Helou et al., 2013). Dans une autre étude menée sur le récepteur EphA4, une autre protéine d'adhésion cellulaire impliquée dans la plasticité synaptique, ainsi que certains de ses ligands les éphrines (Efn), les auteurs ont montré que des E-boxes se retrouvent dans les promoteurs d'EphA4 et EfnB3 (Freyburger et al., 2016). De plus, il a été observé qu'*EphA4* est exprimé dans les NSC et que ses niveaux d'expression, ainsi que ceux de *EfnA3* et *EfnB2*, sont altérés chez des souris *Clock* mutantes (Freyburger et al., 2016). Il a aussi été montré que l'expression d'E-Cadhérine, une autre molécule d'adhésion cellulaire, oscille selon un rythme

circadien au niveau des reins chez le rat (Yamato et al., 2010). Ces données suggèrent donc que les protéines de l'horloge joueraient un rôle dans la régulation de la plasticité synaptique de par leur implication dans le contrôle de l'expression de protéines synaptiques. De plus, les boucles de rétroaction de l'horloge sont aussi soumises à des mécanismes participant à leur régulation. Parmi ceux-ci, nous retrouvons des modifications post-traductionnelles des protéines de l'horloge impliquant des kinases.

1.3 La protéine GSK3 β

1.3.1 Propriétés de GSK3 β

Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) est une protéine kinase sérine/thréonine qui a été nommée ainsi suite à son habileté à phosphoryler et inhiber la Glycogen Synthase, une enzyme importante dans la synthèse du glycogène (Grimes et Jope, 2001). Il existe deux isoformes de la protéine, soit GSK3 α et GSK3 β . GSK3 β , la plus petite des deux isoformes, est une protéine de 47 kD, ayant 85% d'homologie avec GSK3 α (Woodgett, 1990). Elle est localisée dans tous les tissus, avec de hauts niveaux d'abondance dans le cerveau (Woodgett, 1990). Contrairement à la plupart des protéines kinases qui doivent être phosphorylées pour être actives, GSK3 β est constitutivement active dans les cellules et sa phosphorylation, sur la sérine-9 située à son extrémité N-terminale, inhibe son activité enzymatique (Stambolic et Woodgett, 1994; Dajani et al., 2001; Eldar-Finkelman, 2002). En contrepartie, son activité enzymatique est augmentée lorsque GSK3 β est phosphorylée sur sa tyrosine-216,

site conservé chez les deux membres de la famille GSK3 (Hughes et al., 1993; Dajani et al., 2001; Eldar-Finkelman, 2002). De plus, pour faciliter la phosphorylation de la plupart de ses substrats, GSK3 β nécessite un motif de reconnaissance qui, dans ce cas-ci, est une pré-phosphorylation des substrats sur une sérine ou thréonine, ce qui est non-conventionnel pour des protéines kinases (Plyte et al., 1992; Eldar-Finkelman, 2002; Del'Guidice et al., 2015). Finalement, la formation de certains complexes protéiques avec GSK3 β contribue à l'augmentation ou la diminution de son activité enzymatique, dépendamment des protéines impliquées (Grimes et Jope, 2001).

1.3.2 Rôles de GSK3 β

GSK3 β joue un rôle dans une multitude de processus impliqués dans le métabolisme, la signalisation cellulaire, le développement neuronal, l'inflammation, ou encore diverses maladies incluant le cancer. Grimes et Jope (2001), Eldar-Finkelman (2002), ainsi que Thotala et Yazlovitskaya (2011), entre autres, ont passé en revue plusieurs de ces rôles. Parmi ceux-ci, une dérégulation de GSK3 β serait associée au métabolisme du glucose et à la voie de signalisation de l'insuline. Une des caractéristiques majeures des muscles diabétiques est l'inhibition sévère de la Glycogen Synthase, un substrat de GSK3 β essentiel à la synthèse de glycogène. Dans des tissus sensibles à l'insuline directement impliqués dans le diabète de type 2, des niveaux d'activité de GSK3 significativement plus élevés ont été observés. Ces niveaux élevés mèneraient à une forte phosphorylation d'IRS-1 qui ne pourra plus lier

le récepteur de l'insuline, et qui perturberait donc la cascade de signalisation de l'insuline (Eldar-Frinkelman, 2002; Thotala et Yazlovitskaya, 2011). GSK3 β est aussi associée à la neurodégénérescence et l'inflammation. Dans la maladie d'Alzheimer, par exemple, GSK3 β interagit avec plusieurs protéines neuronales, telle que tau, une protéine hyperphosphorylée et impliquée dans les enchevêtrements neurofibrillaires observés dans la maladie (Eldar-Frinkelman, 2002). Cette hyperphosphorylation de tau pourrait être due aux niveaux élevés de GSK3 β observés dans le cerveau de patients malades (Grimes et Jope, 2001). D'autres composants retrouvés dans la maladie d'Alzheimer, les peptides d'amyloïde-beta (A β), induiraient possiblement ces hauts niveaux de GSK3 β (Eldar-Frinkelman, 2002). De plus, GSK3 β est impliquée dans l'apoptose, mécanisme grandement observé dans la maladie d'Alzheimer (Grimes et Jope, 2001; Eldar-Frinkelman, 2002). Un autre rôle de GSK3 β est son implication dans la prolifération de cellules cancéreuses. Des études sur des cellules malignes de cancer du pancréas, colorectal, neuroblastome, et glioblastome ont montré que suite à l'administration d'inhibiteurs de GSK3 β , il y a une diminution de la survie et de la prolifération de ces cellules (Thotala et Yazlovitskaya, 2011). Ainsi, GSK3 β agit sur une multitude de processus cellulaires, ceux mentionnés précédemment et plus encore, ce qui en fait une importante cible à étudier.

1.3.3 Implication de GSK3 β dans la régulation post-traductionnelle des protéines de l'horloge

Les facteurs de transcription, tels que les protéines de l'horloge impliquées dans les boucles de rétroaction régulant le système circadien, subissent énormément de modifications post-traductionnelles qui affectent autant leur localisation cellulaire que leur fonction (Duguay et Cermakian, 2009). Harada et collaborateurs en 2005 ont montré que la phosphorylation de la protéine CRY2 (Cryptochrome 2) sur sa sérine-557 lui confère une localisation nucléaire, alors que la forme non-phosphorylée se situe plutôt dans le cytoplasme et le noyau. Cette phosphorylation est le motif de reconnaissance pour GSK3 β qui, lorsque CRY2 atteint un haut niveau de phosphorylation de sa sérine-557, la phosphoryle sur sa sérine-553 pour initier sa dégradation (Harada et al., 2005). Une autre étude a montré que GSK3 β interagit avec PER2 *in vitro* et *in vivo*, et qu'il peut la phosphoryler, *in vitro*, pour favoriser sa translocation nucléaire (Iitaka et al., 2005). Aussi, il a été montré *in vitro* que GSK3 β phosphoryle et stabilise la protéine REV-ERB α , et que suite à un traitement au lithium, un inhibiteur de GSK3 β , REV-ERB α se fait dégrader et il y a activation de l'expression du gène *Bmal1* (Yin et al., 2006). GSK3 β interagit aussi directement avec la protéine BMAL1 et la phosphoryle sur sa sérine-17 et thréonine-21, favorisant ainsi sa dégradation (Sahar et al., 2010). Lorsque l'activité de GSK3 β est inhibée, BMAL1 est stabilisée et une augmentation des niveaux de cette protéine, mais pas de CLOCK, est observée (Sahar et al., 2010). De plus, chez des souris où GSK3 β est génétiquement régulée négativement (GSK3 β +/-), la durée du rythme circadien endogène de l'activité locomotrice est significativement augmentée (Lavoie et al.,

2013). Toutes ces données suggèrent un rôle modulateur de GSK3 β dans la régulation des protéines de l'horloge, menant à un impact sur les rythmes circadiens, ainsi que sur l'expression des gènes contrôlés par les protéines de l'horloge, tel que possiblement *Nlgn1*.

Chapitre 2 : Objectifs, hypothèses, et contributions spécifiques

2.1 Objectifs

NLGN1 est donc une protéine synaptique importante, participant à la régulation de plusieurs processus cellulaires impliquant la plasticité synaptique. Tel que vu précédemment, son gène est potentiellement sous le contrôle transcriptionnel des facteurs de l'horloge. Afin de mieux comprendre la régulation transcriptionnelle de *Nlgn1* par les facteurs de transcription CLOCK et BMAL1, quatre objectifs principaux ont été fixés. 1) Mesurer l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1* par ces facteurs de transcription et leurs homologues, NPAS2 et BMAL2, via des essais luciférase *in vitro*; 2) Vérifier le rôle modulateur de GSK3 β sur l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1* par le complexe CLOCK/BMAL1 via des essais luciférase *in vitro*; 3) Trouver la séquence spécifique de liaison des facteurs de transcription de l'horloge menant à l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1* via une mutagenèse dirigée et des essais luciférase *in vitro*; 4) Étudier *in vivo* les conséquences d'une protéine CLOCK non-fonctionnelle sur l'expression d'ARN messager et de protéine NLGN1 chez la souris.

2.2 Hypothèses

Suite à ces objectifs, quatre hypothèses ont été émises concernant les résultats attendus. Tout d'abord, concernant l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1*

par CLOCK et BMAL1, il a été montré dans El Helou et al. (2013) que ces facteurs de transcription lient le promoteur de *Nlgn1 in vivo* via un segment contenant une séquence E-box, et qu'après une privation de sommeil, il y a détachement de ces facteurs. Il a aussi été observé que suite à la privation de sommeil, les niveaux d'expression de *Nlgn1* sont diminués (El Helou et al., 2013), ce qui suggère un rôle de CLOCK et BMAL1 dans la régulation de la transcription de ce gène. Notre première hypothèse est donc que CLOCK et BMAL1, ainsi que leurs homologues NPAS2 et BMAL2, activeront la transcription de *Nlgn1 in vitro*. Par la suite, la deuxième hypothèse concerne l'effet modulateur de la kinase GSK3 β sur le complexe CLOCK/BMAL1. Comme vu à la section 1.3.3, GSK3 β est impliquée dans la dégradation de BMAL1 (Sahar et al., 2010), et est donc sujette à perturber la formation du complexe CLOCK/BMAL1 et à l'empêcher de transcrire ses gènes cibles. Notre hypothèse est donc que GSK3 β inhibera la potentielle activation transcriptionnelle de *Nlgn1* médiée par CLOCK et BMAL1 *in vitro*. Notre troisième hypothèse concerne la mutation des E-boxes de la séquence d'intérêt du promoteur de *Nlgn1*, et prévoit une diminution de l'activation transcriptionnelle par CLOCK et BMAL1 suite à la mutation des E-boxes. Finalement, puisque CLOCK et BMAL1 forment un complexe important pour la transcription de leurs gènes cibles, il a été émis comme hypothèse que la mutation de CLOCK chez la souris induira une diminution de l'expression de l'ARN messager et de la protéine NLGN1 *in vivo*.

2.3 Contributions spécifiques de l'auteure principale

Pour mon projet de maîtrise, j'ai principalement travaillé sur les expériences *in vitro* basées sur les trois premiers objectifs : 1) Mesurer l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1* médiée par CLOCK/BMAL1 et leurs homologues, 2) Mesurer l'effet de GSK3 β sur l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1* par CLOCK/BMAL1, et 3) trouver la séquence exacte de liaison de ces éléments transcriptionnels au promoteur de *Nlgn1*. Ces expériences *in vitro* se résument au clonage d'une partie du promoteur de *Nlgn1* (et de *Nlgn2*) dans des vecteurs d'expression; à des essais luciférase impliquant les éléments CLOCK, BMAL1, NPAS2, BMAL2, GSK3 β (et son inhibiteur TDZD-8); et à de la mutagenèse dirigée pour introduire des mutations aux E-boxes inclus dans la région étudiée du gène *Nlgn1*. J'ai été la principale personne impliquée dans la rédaction de l'article et l'interprétation des résultats *in vitro* et *in vivo*. Les résultats *in vivo* seront ainsi inclus dans la discussion du présent mémoire.

Préambule au Chapitre 3 : Contributions des co-auteurs à l'article

Erika Bélanger-Nelson a contribué à la réalisation et à la collecte de données de plusieurs expériences *in vitro* et *in vivo* (exemple : clonage et essais luciférase avec *Neuroligine-1* (*Nlgn1*) [Fig. 1B, 1C, 3A, 3B], expression de l'ARNm de *Nlgn1* [Fig. 4B, 4C], expression de la protéine NLGN1 [Fig. 5A, 5B]). Elle a aussi analysé les données des Fig. 4B, 4C, et 5B, et participé à la rédaction des méthodologies correspondantes.

Emma K. O'Callaghan a participé à la réalisation des schémas des gènes *Nlgn1* et *Nlgn2* (Fig. 1A et 2A), et à la collecte de données des essais luciférase avec *Nlgn1* mutant (Fig. 1D). Elle a aussi participé à la rédaction de la méthodologie concernant les Fig. 4B et 4C, ainsi qu'à l'écriture de la discussion correspondante. Julien Dufort-Gervais a participé aux expériences des Fig. 5A et 5B, et à la rédaction de la méthodologie correspondante. Maria Neus Ballester Roig a participé à la collecte des données des essais luciférase avec *Nlgn2* (Fig. 2B) ainsi qu'avec les plasmides pGL3 et pGL2 vides (Fig. 1B et 2B). Pierre-Gabriel Roy a aussi participé à la collecte des données des essais luciférase avec *Nlgn2* (Fig. 2B) ainsi qu'à l'analyse de ces données.

Jean-Martin Beaulieu et Nicolas Cermakian ont contribué au design de l'étude, à la rédaction du manuscrit, et à l'acquisition de certains réactifs pour les expériences *in vitro* (Fig. 1B, 1C, 1D, 2B, 3A, 3B) et *in vivo* (Fig. 4B, 4C, 5A, 5B).

Valérie Mongrain a généré les hypothèses de recherche, a mis sur pied le design de l'étude, a supervisé l'organisation des expériences, et a participé à fournir les réactifs pour les expériences et à la rédaction du manuscrit. Elle a aussi participé à la réalisation des expériences *in vivo* (Fig. 4B, 4C, 5A, 5B), et à l'analyse des données correspondantes, ainsi qu'à la réalisation du schéma présentant les variants transcriptionnels de *Nlgn1* (Fig. 4A).

Chapitre 3 : Méthodologies et Résultats – Article de recherche

Regulation of the *Neuroigin-1* Gene by Clock Transcription Factors

Article soumis pour publication le 24 décembre 2017 à *Journal of Biological Rhythms*

(Acceptation de l'article reçue le 25 janvier 2018)

Regulation of the *Neurologin-1* Gene by Clock Transcription Factors

Lydia Hannou,^{*,£,1} Erika Bélanger-Nelson,^{£,1} Emma K. O'Callaghan,^{£,¥} Julien Dufort-Gervais,^{£,§} Maria Neus Ballester Roig,^{£,¥} Pierre-Gabriel Roy,^{£,¥} Jean-Martin Beaulieu,[‡]
Nicolas Cermakian,[†] and Valérie Mongrain^{£,¥,2}

**Department of Psychiatry, Université de Montréal, Montreal, Quebec, £Center for Advanced Research in Sleep Medicine and Research Center, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Montreal, Quebec, ¥Department of Neuroscience, Université de Montréal, Montreal, Quebec, §Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, ‡Department of Pharmacology and Toxicology, University of Toronto, Toronto, Ontario, †Douglas Mental Health University Institute and Department of Psychiatry, McGill University, Montreal, Quebec*

¹These authors contributed equally to this work.

²Corresponding author:

Valérie Mongrain, Ph.D.

Center for Advanced Research in Sleep Medicine and Research Center

Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal

5400 Gouin West Blvd.

Montreal, QC, Canada, H4J 1C5

valerie.mongrain@umontreal.ca; (514) 338-2222 #3323.

Manuscript submitted to *Journal of Biological Rhythms*: 30 pages, 5 figures, 1 table.

Running title

Transcription of *Neurologin-1* by clock proteins.

Abstract

NEUROLIGIN-1 (NLGN1) is a post-synaptic adhesion molecule involved in the regulation of glutamatergic transmission. It has been associated with several features of sleep and psychiatric disorders. Our previous work suggested that the transcription of the *Nlgn1* gene could be regulated by the transcription factors CLOCK and BMAL1 because they bind to the *Nlgn1* gene promoter *in vivo*. However, whether CLOCK/BMAL1 can directly activate *Nlgn1* transcription is not yet known. We thus aimed to verify if CLOCK/BMAL1, as well as their homolog NPAS2 and BMAL2, can activate transcription via the *Nlgn1* promoter by using luciferase assays in COS-7 cells. We also investigated how *Nlgn1* expression was affected in *Clock* mutant mice. Our results show transcriptional activation *in vitro* mediated by CLOCK/BMAL1 and by combinations with their homologs NPAS2 and BMAL2. Moreover, CLOCK/BMAL1 activation via the *Nlgn1* gene fragment was repressed by GSK3 β . *In vivo*, *Nlgn1* mRNA expression was significantly modified in the forebrain of *Clock* mutant mice in a transcript variant-dependent manner. However, no significant change in NLGN1 protein level was observed in *Clock* mutant mice. These findings will increase knowledge about the transcriptional regulation of *Nlgn1* and on the relationship between circadian rhythms, mental health, and sleep.

Keywords

Cell adhesion molecules, transcription, E-boxes, clock proteins, luciferase assay, gene expression, mice, circadian timing system.

Introduction

Neuroligins (NLGNs) are postsynaptic adhesion molecules interacting with presynaptic Neurexins (NRXNs) to mediate cell adhesion (Nguyen and Südhof, 1997; Song et al., 1999). Neuroligin-1 (NLGN1) is a member of this system that is mostly localized at excitatory glutamatergic synapses, where it determines the number of functional N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) and thus modulates NMDAR-dependent forms of plasticity (Barrow et al., 2009; Jung et al., 2010). NLGN1 was shown to play roles in synaptogenesis (Chih et al., 2005; Barrow et al., 2009; Kwon et al., 2012) as well as in the regulation of sleep and wakefulness (El Helou et al., 2013; Massart et al., 2014). Also, NLGN1 deletion impairs spatial memory and social behavior, and increases repetitive behaviors (Blundell et al., 2010; El Helou et al., 2013), which links this synaptic protein to psychiatric diseases like autism spectrum disorders. Nonetheless, the regulation of the expression of the *Nlgn1* gene remains poorly understood.

The literature suggests regulation of *Nlgn1* expression by epigenetic mechanisms. For instance, the gene expression of *Nlgn1* is altered in the brain of mice lacking methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2), a transcriptional regulator binding to methylated genomic sequences (Runkel et al., 2013). In addition, gene repression via DNA methylation has been reported for *Nlgn1* following treatment with amyloid beta fibrils (Bie et al., 2014). In parallel, we have shown that the expression of a specific transcript variant of *Nlgn1* varies with time-of-day in the mouse forebrain

(El Helou et al., 2013), which could suggest transcriptional regulation by clock proteins.

Among clock proteins, CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput) and BMAL1 (brain and muscle Arnt-like protein-1; also known as aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 [Arntl]) are core elements of the transcriptional-translational feedback loop that governs circadian rhythms in mammals (Ko and Takahashi, 2006). CLOCK and BMAL1 (or their homologs NPAS2 and BMAL2, respectively), dimerize and generally bind to a gene sequence of six nucleotides called E-box to activate transcription (Gekakis et al., 1998; Hogenesh et al., 1998; Dardente et al., 2007). We have reported the presence of several E-boxes in the mouse *Nlgn1* gene, some of these being conserved across different species (El Helou et al., 2013). Furthermore, we found that CLOCK and BMAL1 bind rhythmically to a sequence of the *Nlgn1* gene that contains a consensus (i.e., CACGTG) E-box (El Helou et al., 2013). These observations suggest a transcriptional regulation of *Nlgn1* by core clock transcription factors.

Post-translational modifications, and in particular phosphorylation, are of particular relevance to the functioning of the molecular circadian clock by, notably, shaping trafficking in and out of the nucleus as well as protein degradation (Duguay and Cermakian, 2009). Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) is a multifunctional serine/threonine kinase, which has been reported to phosphorylate clock components such as PER2 (Period 2), CRY2 (Cryptochrome 2) and REV-ERB α in mammals, leading to different effects, including protein degradation and stabilization (Harada et al., 2005; Yin et al., 2006). GSK3 β also phosphorylates serine 17 and threonine 21 of

BMAL1, which leads to its degradation (Sahar et al., 2010), and genetic downregulation of GSK3 β modifies the length of the endogenous circadian period of locomotor activity in mice (Lavoie et al., 2013). This supposes a modulatory role of GSK3 β on the activity of the CLOCK/BMAL1 heterodimer and thus on the regulation of its demonstrated and putative target genes, such as *Nlgn1*.

In this study, *in vitro* luciferase assays were performed to investigate the transcriptional activation of *Nlgn1* by CLOCK, BMAL1, and their homologs, as well as the modulatory role of GSK3 β . Luciferase assays were also performed on a fragment of the *Nlgn2* promoter to test whether this regulation by CLOCK/BMAL1 is specific for *Nlgn1* within the NLGN/NRXN system. In addition, to understand which nucleotides of the *Nlgn1* gene are specifically involved in transcriptional activation by CLOCK/BMAL1, site-directed mutagenesis was used. Finally, *in vivo* support for transcriptional regulation of *Nlgn1* by clock transcription factors was investigated using mRNA and protein quantifications in *Clock* ^{$\Delta 19/\Delta 19$} mutant mice. Our results support a contribution of core clock factors to the regulation of *Nlgn1* gene expression.

Materials and Methods

Molecular Cloning

A 969 bp DNA fragment, including one canonical and three non-canonical E-boxes, corresponding to the region (-1159/ -190) of the mouse *Nlgn1* promoter (Figure 1A) was PCR-amplified from mouse ear genomic DNA (50 ng genomic DNA in 25 µl PCR mixture). E-box mutations were generated by overlapping PCR mutagenesis as previously described (Guillaumond et al., 2005; Mongrain et al., 2008), using the 969 bp *Nlgn1* promoter cloned into pGL3-Basic plasmid (see hereafter) as a template. The 1st and 2nd rounds of PCR were carried out with a primer pair having the mutation in the Reverse primer and the Forward primer, respectively. A 1167 bp DNA fragment, including five non-canonical E-boxes, corresponding to the region (-1387/ -220) of the mouse *Nlgn2* promoter (Figure 2A) was PCR-amplified from mouse ear genomic DNA (50 ng genomic DNA in 25 µl PCR mixture). Oligonucleotide sequences used in PCR reactions are listed in Table 1. Wild-type (WT) and mutant *Nlgn1* promoter sequences (Figure 1A) were cloned between *XhoI* and *HindIII* sites in a pGL3-Basic vector (Promega Corporation, Madison, WI) that encodes luciferase protein and ampicillin resistance gene. *Nlgn1* and *Nlgn2* (Figure 2A) WT promoter sequences were cloned, respectively, between *XhoI* and *HindIII* sites and between *SmaI* and *XhoI* sites in a pGL2-Basic vector (Promega Corporation) that encodes luciferase protein and ampicillin resistance gene. Plasmids were sequenced at McGill University and Genome Quebec Innovation Centre (Montreal, Canada).

Cell Culture and Transfection

COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; HyClone, Logan, UT) supplemented with 10% fetal bovine serum, and 1% L-glutamine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. COS-7 cells were transfected in 24-well plates (seeded at 1×10^5 cells/well) using 2 μ l Lipofectamine LTX (Invitrogen, Carlsbad, CA) with a total of 700 ng of expression plasmids. The plasmid mix included 50 ng of luciferase reporter plasmid (pGL3-Basic or pGL2-Basic) containing an insert or not (insert: non-mutated or mutated *Nlgn1* or *Nlgn2* sequence), 200 ng of pSG5-CLOCK (Travnickova-Bendova et al., 2002) or pSG5-NPAS2 (Dardente et al., 2007) or pSG5, 200 ng of pCS2-MTK-BMAL1 (Travnickova-Bendova et al., 2002) or pCS2-MTK-BMAL2 (Dardente et al., 2007) or pCS2-MTK, 25 ng of pCR3-LacZ (Invitrogen), and 225 ng of pBluescript (Stratagene, San Diego, CA) as a carrier. As a positive control, the assay was also performed in parallel with 25 ng of a pGL3-basic plasmid containing a ~1.8 kb portion of the *Per1* promoter (Travnickova-Bendova et al., 2002).

For the experiments aimed to examine whether GSK3 β can inhibit the CLOCK/BMAL1-driven activation of the *Nlgn1* selected region, 50 ng of pcDNA3-HA-GSK3 β WT (Addgene, Cambridge, MA; Jim Woodgett, Mont Sinai Hospital, Toronto, ON, CA; He et al., 1995) or pcDNA3-GSK3 β -S9A (Stambolic and Woodgett, 1994) or pcDNA3.1(+) (part #V790-20, Invitrogen) was added to the plasmid mix described above. One hundred seventy-five ng of pBluescript vector as a carrier was included to maintain a total of 700 ng plasmid mix. Five to six hours following transfection, 500 μ l COS-7 medium was added to each well, and cells were grown overnight at 37°C. For

experiments aimed to examine whether 4-benzyl-2-methyl-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione (TDZD-8; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) can counteract the inhibitory effect of GSK3 β on the selected *Nlgn1* region, 50 and 100 μ M of TDZD-8 were added to conditions of interest described above, and incubated for 1 h at 37°C before luciferase assay.

Luciferase Assay

Luciferase assays were performed as described previously (Dardente et al., 2007, Mongrain et al., 2008). Cells were rinsed with PBS 1X and lysed by shaking 10 min in 150 μ l of lysis buffer [25 mM Tris, 2 mM EDTA, 1 mM DTT (dithiothreitol), 10% (v/v) glycerol, 1% Triton X-100]. Twelve μ l of lysate were transferred in a 96-well luminometer microplate and 50 μ l of luciferase buffer [20 mM Tris/phosphate pH 7.8, 1 mM MgCl₂, 2.7 mM MgSO₄, 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT, 530 μ M ATP, 270 μ M Coenzyme-A, 470 μ M D-Luciferin] were injected automatically and luciferase counts measured using an EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA).

A β -galactosidase assay was then performed by mixing 30 μ l of lysate (or lysis buffer as a blank) with 750 μ l of a solution containing 0.27% of β -mercaptoethanol (Bio-Rad, Hercules, CA) in buffer Z [40 mM NaH₂PO₄.H₂O, 60 mM Na₂HPO₄.7H₂O, 1 mM MgSO₄.7H₂O, 10 mM KCl], and incubated 5 min at 37°C. One hundred fifty μ l of a solution containing 4 mg/ml of 2-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG; Sigma-Aldrich) and buffer Z was then added to the mix and incubated for 5 to 20 min at 37°C, until a yellow coloration appeared (except for the blank). To stop the reaction,

375 μ l of 1 M Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich) was added and 200 μ l of the mix was transferred in a 96-well microplate. The absorbance was measured at 420 nm.

Finally, a DC protein assay (Bio-Rad) was performed by transferring 20 μ l of lysate (or lysis buffer as a blank) in a 96-well microplate and adding 25 μ l of a solution composed of 2% of reagent S and 98% of reagent A. Two-hundred μ l of reagent B were then added, and the mix was incubated 15 min at room temperature. The absorbance was measured at 750 nm. Relative luciferase activity was calculated by dividing luciferase counts by β -galactosidase and DC assay absorbances. Data were then expressed in fold induction over the negative control (empty vectors). Experiments were carried out at least in triplicate and the number of replicates is indicated on each bar of associated figures.

Animals and Protocol

Clock ^{$\Delta 19/\Delta 19$} homozygous mice and their WT littermates were the same animals as those used in previous studies (Mongrain et al., 2008; Freyburger et al., 2016). Briefly, *Clock* ^{$\Delta 19$} heterozygous mutant mice described in Vitaterna et al. (1994) were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), and backcrossed with BALB/c mice (Charles River Laboratories, Wilmington, DE) to increase breeding efficiency (50:50 C57Bl/6J and BALB/c background). *Clock* homozygous mice (*Clock* ^{$\Delta 19/\Delta 19$}) and WT littermates were entrained to a 12 h light: 12 h dark cycle (LD 12:12) for 2 weeks (with Zeitgeber time 0 [ZT0] = lights ON), and then sacrificed every 6 h under LD12:12 (ZT2, ZT8, ZT14, ZT20; n = 4–5 per genotype per time). All mice were sacrificed by cervical dislocation, and brains were immediately frozen on dry ice.

Right forebrains were subsequently dissected to perform RNA extraction, while left forebrains were used for protein extraction (see below). Experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of the Douglas Mental Health University Institute, and carried out in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

RNA Extraction and Quantitative PCR

RNA extraction, reverse transcription, and quantitative PCR (qPCR) for detection of *Nlgn1* transcript variants were performed as outlined previously (El Helou et al., 2013; Massart et al., 2014). Quantification of *Per2* steady-state mRNA level was also performed as a positive control. In brief, RNA was extracted from right forebrains using the RNeasy Lipid Tissue Midi kit and was Dnase-treated (Qiagen, Hilden, Germany). RNA amount and quality was verified with a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) and agarose gel electrophoresis. Reverse transcription was performed with 0.5 µg of RNA using random hexamers and Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA), according to manufacturer's instructions. qPCR was performed using a ViiA 7 real-time cycler (Life Technologies). Individual mouse cDNA was diluted and used in a 10-µl reaction with Fast TaqMan Master Mix reagent (Life Technologies) under fast cycling conditions: 50°C for 2 min, 95°C for 20 sec, followed by 40 cycles of 95°C for 1 sec and 60°C for 20 sec. PCR for each sample was performed in triplicate. Normalization was performed against three endogenous controls: beta-glucuronidase (GusB), ribosomal protein S9 (Rps9), and TATA-box binding protein (Tbp) using Expression Suite

Software v1.1 (Life Technologies). The primer and probe sequences used for qPCR are shown in Table 1. Relative quantification was calculated using a modified $\Delta\Delta C_t$ method (Expression Suite Software v1.1).

Protein Extraction and Western Blot

Total protein was extracted from left forebrains of *Clock* ^{$\Delta 19/\Delta 19$} mutant mice and WT littermates as follows (procedure adapted from Giannone et al., 2013): tissues were rinsed in ice-cold PBS 1X before being placed in ice-cold modified RIPA buffer [50 mM HEPES, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% IGEPAL, 0.5% Sodium deoxycholate, protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich)] and homogenized on ice (PowerGen 125 homogenizer, Thermo Fisher Scientific) until translucent (2-3 min). Homogenates were centrifuged at 8000 g for 40 min at 4°C, and the supernatant was kept at -80°C for subsequent analysis.

Forty μ g of protein of each sample (4) were loaded on gel for each time point and genotype. SDS-PAGE was done using a 10% precast gel (Bio-Rad) at 125 V for 65 min. Proteins were then transferred on a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) at 100 V for 40 min. The membrane was blocked with blocking buffer (5% non-fat dry milk diluted in PBS-T) for 1 h at room temperature. Primary anti-NLGN1 antibody (1:1000, #129111, Synaptic System, Göttingen, Germany) diluted in blocking buffer was incubated overnight at 4°C. After washes in PBS-T, mouse anti-Actin antibody (1:5000, #A5441, Sigma-Aldrich) was added for 1 h at room temperature. Membrane was washed again and a fluorescent anti-mouse secondary antibody (1:15000, IRDye 680RD, LI-COR, Lincoln, NE) diluted in blocking buffer was incubated for 1 h at room

temperature. Membrane was revealed using Odyssey CLx imaging system (LI-COR) and analysed using ImageStudio 3.1 software (LI-COR). Quantification of NLGN1 was normalized relative to Actin.

Statistical Analyses

Fold induction of relative luciferase activity were compared between conditions using one-way analyses of variance (ANOVAs) for WT and mutated *Nlgn1* and *Nlgn2* sequences, and using unpaired t-tests for *Per1*. Gene expression of *Per2* and *Nlgn1* transcript variants and NLGN1 protein level were analysed using two-way ANOVAs with factors Genotype and Time. Significant effects were decomposed using post hoc Tukey's multiple comparisons, simple effect analysis or unpaired t-tests. The threshold for statistical significance was set to 0.05, and results are reported as mean and standard error of the mean.

Results

*Transcriptional activation of *Nlgn1* by CLOCK/BMAL1*

To assess if CLOCK and BMAL1 can directly activate the transcription of the *Nlgn1* gene, a 969 bp fragment from the putative promoter of *Nlgn1* that contained four E-boxes was cloned in front of a luciferase gene in pGL3 vector to perform luciferase assays in COS-7 cells (Figure 1A). The condition with both CLOCK and BMAL1 showed a 3.4-fold induction compared to the negative control without CLOCK and BMAL1, and no significant induction was observed for conditions with only CLOCK or BMAL1 (Figure 1B; $F_{5,107} = 56.6$, $p < 0.0001$). This induction was significantly higher than that observed with CLOCK and BMAL1 using the empty pGL3 vector ($p < 0.001$).

In order to compare this transcriptional activation with that of a known clock gene and to confirm validity of the luciferase assay, transcriptional activation via the *Per1* promoter was quantified in parallel. Compared to the negative control condition with empty plasmids, *Per1* promoter had a 20-fold induction with CLOCK- and BMAL1-expressing plasmids (Figure 1B; $t = 15.4$, $p < 0.0001$). Given that the empty pGL3 vector contains a series of three E-boxes in the 225 bp just upstream the luciferase gene in the absence of insert, and that CLOCK and BMAL1 increased luciferase counts using this vector (Figure 1B), we further validated transcriptional activation by CLOCK and BMAL1 via the *Nlgn1* gene fragment using a second expression vector, pGL2. In addition, we simultaneously assessed if transcriptional activation by CLOCK and BMAL1 could be observed for another gene of the same

adhesion system by performing the assay using a fragment of the *Nlgn2* putative promoter, which contained five E-boxes (Figure 2A). Transcriptional activation by CLOCK and BMAL1 via the *Nlgn2* gene showed a 1.6-fold induction compared to the negative control, which was significantly lower than the 2.4-fold induction observed with *Nlgn1* (Figure 2B; $F_{5,69} = 15.3$, $p < 0.0001$). CLOCK/BMAL1 did not induce transcriptional activation of the empty pGL2 vector. These results suggest that CLOCK and BMAL1 can activate transcription of the *Nlgn1* gene and to a lesser extent that of the *Nlgn2* gene.

To investigate if homologs of CLOCK and BMAL1, respectively NPAS2 and BMAL2, can also drive transcription via the promoter of *Nlgn1*, luciferase assays were performed with different combinations of plasmids expressing CLOCK, NPAS2, BMAL1 and BMAL2. With NPAS2 and BMAL1, a 3.2-fold induction was observed compared to the negative control, which is similar to the 3.4-fold induction seen with CLOCK and BMAL1, whereas a 2-fold induction was observed with CLOCK and BMAL2 (Figure 1C; $F_{4,112} = 80.2$, $p < 0.0001$). In contrast, the condition with NPAS2 and BMAL2 did not result in a significant induction compared to the control. This indicates that *Nlgn1* transcription can also be controlled by homologs of CLOCK and BMAL1.

To identify which specific nucleotide sequences are responsible for transcriptional activation of the *Nlgn1* gene by CLOCK and BMAL1, mutations were introduced in three E-boxes of the cloned sequence of *Nlgn1* putative promoter (Figure 1A) and used for luciferase assays. The first mutation was targeted to the canonical E-box, and the second and third mutations targeted the two non-canonical

E-boxes just downstream the canonical E-box. Contrary to expectations, the first two mutations did not decrease transcriptional activation driven by CLOCK and BMAL1. Indeed, compared to the 3.4-fold induction obtained with the WT sequence, the induction was around 4 with the mutated canonical E-box, and around 4.2-fold with the addition of the following non-canonical E-box mutation, which was significantly higher than the WT sequence (Figure 1D; $F_{7,178} = 79.8$, $p < 0.0001$). However, the addition of a third mutated E-box led to a 2.7 fold induction, which was significantly lower than that observed for the WT *Nlgn1* gene fragment as well as that of the first two mutant constructs.

GSK3 β represses CLOCK/BMAL1 transcriptional activation of Nlgn1

GSK3 β is known to phosphorylate BMAL1, which leads to the destabilisation of the heterodimer with CLOCK (Sahar et al., 2010). We thus tested the modulatory role of GSK3 β on the transcriptional activity of CLOCK and BMAL1 upon *Nlgn1*. To do so, luciferase assays were performed with conditions including CLOCK, BMAL1, and a WT GSK3 β or a mutated form of GSK3 β where serine 9 is replaced by an alanine (GSK3 β S9A). This mutation leads to a constitutively active form of GSK3 β , as serine 9 phosphorylation inhibits GSK3 β kinase activity (Stambolic and Woodgett, 1994; Beaulieu, 2012). The addition of WT GSK3 β to the condition with CLOCK and BMAL1 significantly decreased transcriptional activation via the cloned *Nlgn1* fragment, whereas the addition of GSK3 β S9A blocked it (Figure 3A; $F_{3,54} = 49.8$, $p < 0.0001$).

To test the effect of a GSK3 β inhibitor on the transcriptional activation of *Nlgn1*, TDZD-8 has been used in luciferase assays since it selectively inhibits GSK3 β by

acting as a noncompetitive inhibitor of substrate binding (Martinez et al., 2002). TDZD-8 was also shown to increase phosphorylation of GSK3 β serine 9 (Collino et al., 2008). To investigate the potential to inhibit endogenous GSK3 β , conditions with only CLOCK and BMAL1 were tested. For these conditions, the fold induction was around 4 after one hour of incubation with the vehicle (PBS 1X). An induction of 4.5-fold was seen with a one hour incubation with 50 μ M of TDZD-8, and a 4.8-fold induction was observed with one hour incubation with 100 μ M of TDZD-8 (Figure 3B; $F_{11,166} = 42.1$, $p < 0.0001$), which showed a tendency for a higher induction compared to the vehicle condition ($p = 0.056$). TDZD-8 at the two tested doses did not significantly prevent the inhibition of CLOCK/BMAL1 transcriptional activation of *Nlgn1* by WT GSK3 β , and did not affect that of the constitutively active GSK3 β S9A (Figure 3B). These results may suggest that the inhibitory effect of TDZD-8 requires physiological GSK3 β level (i.e., no overexpression), and point to a modulatory role of GSK3 β on CLOCK/BMAL1-driven transcriptional regulation of *Nlgn1*.

Altered Nlgn1 mRNA in Clock mutant mice

We then aimed at verifying the specific implication of CLOCK in the regulation of *Nlgn1* expression *in vivo*. To do so, the mRNA steady-state level of four different transcripts of *Nlgn1* was measured in the right forebrain of *Clock* $^{\Delta 19/\Delta 19}$ mutant mice and WT littermates at four different times of the day (Figure 4). We used probes specifically targeting the presence of an insert in splice site A, the absence of insert in splice site A, the presence of an insert in splice site B, and the absence of insert in splice site B (Figure 4A) as done previously (El Helou et al., 2013). The expression of

Nlgn1 with the presence or the absence of insert A was significantly decreased in *Clock*^{Δ19/Δ19} mutant mice compared to WT mice (Figure 4B; Genotype effect: $F_{1,3} > 5$, $p < 0.05$). There was no significant difference between genotypes or interaction with time-of-day concerning the expression of *Nlgn1* with an insert B (Genotype effect: $F_{1,3} = 0.9$, $p = 0.3$; Genotype by Time interaction: $F_{3,29} = 2.2$, $p = 0.1$). However, the expression quantified during the early dark phase (ZT14), which corresponds to the lowest expression in WT mice, was higher in *Clock*^{Δ19/Δ19} mutant than in WT mice ($p < 0.02$). Similarly, the expression of *Nlgn1* without insert B was significantly changed in *Clock*^{Δ19/Δ19} mutant mice in comparison to WT mice (Figure 4B; Genotype by Time interaction: $F_{3,27} = 3.7$, $p = 0.02$), with expression during the light period being significantly lower in mutant than in WT mice. In parallel, we validated that the *Clock*^{Δ19} mutation abolished the rhythmic expression of the clock gene *Per2* in the mouse forebrain, which peaks at ZT14 (Figure 4C; Genotype by Time interaction: $F_{3,32} = 5.2$, $p < 0.01$).

NLGN1 protein in Clock mutant mice

Since a change in mRNA levels does not necessarily reflect a change at the protein level, total NLGN1 protein was quantified at the same four times of the day in the left forebrain of *Clock*^{Δ19/Δ19} mutant mice and WT mice (Figure 5). Global NLGN1 level was not significantly changed in *Clock* mutant mice in comparison to WT mice (Genotype effect: $F_{1,3} = 0.2$, $p = 0.6$), and there was also no significant impact of the mutation on rhythmic NLGN1 protein level (Genotype by Time interaction $F_{3,24} = 0.8$, $p = 0.5$). Together, mRNA and protein measurements in *Clock* mutant mice may

suggest a complex regulation of *Nlgn1* by clock elements *in vivo* that does not necessarily impact total protein level.

Discussion

Our previous work showed that the core clock transcription factors, CLOCK and BMAL1, bind to the *Nlgn1* gene in the mouse cerebral cortex in a time-of-day dependent manner (El Helou et al., 2013). Here, we showed that CLOCK and BMAL1 can together induce transcriptional activation via a sequence of *Nlgn1* putative promoter region, an activation that is repressed by the clock regulator GSK3 β . We also observed that NPAS2 and BMAL2 can substitute for CLOCK and BMAL1, respectively, to induce expression of the *Nlgn1* gene. Moreover, gene expression data in *Clock* mutant mice further support a transcriptional regulation of *Nlgn1* by the molecular clock, an effect that appears to be transcript variant-specific. Overall, our present findings point to a contribution of core clock proteins in the transcriptional regulation of the synaptic component NLGN1.

Our *in vitro* data indicate that the dimers CLOCK:BMAL1 and NPAS2:BMAL1 can equally activate transcription via a fragment of the *Nlgn1* gene. The activation by CLOCK:BMAL2 was lower, whereas no activation was observed in the case of the dimer NPAS2:BMAL2. Our findings of lower transcriptional activation with BMAL2 are similar to those made previously for the *Per1* gene (Dardente et al., 2007). NPAS2 is expressed in the mouse forebrain and was reported to form a heterodimer with BMAL1 that is transcriptionally active (Garcia et al., 2000), which is in line with our findings for *Nlgn1*. Also, NPAS2 was shown to compensate for the absence of CLOCK when considering circadian functions (DeBruyne et al., 2006, 2007). Concerning BMAL2, it was earlier shown not to compensate for deficits in circadian features of the locomotor activity rhythm in *Bmal1* knockout mice (Bunger et al.,

2000), but this was found to result from a *Bmal2* downregulation in *Bmal1* knockout (Shi et al., 2000). However, BMAL2 cannot rescue circadian rhythm of gene expression in *Bmal1* knockout fibroblasts, which was proposed by the authors to originate from the lack of a nuclear localisation signal in BMAL2 following assays with BMAL1-BMAL2 chimeric constructs (Xu et al., 2015). Contrary to our findings, this study nevertheless reported a similar efficiency of BMAL1 and BMAL2 in steady-state transcriptional activation (Xu et al., 2015). In our study, only steady-state transcriptional activation was measured and whether core clock transcription factors can drive a transcriptional rhythm of *Nlgn1* expression in cells remains unknown. Future work should thus investigate if CLOCK, BMAL1, NPAS2 and BMAL2 can drive a rhythm of *Nlgn1* expression *in vitro* using continuous bioluminescence records.

CLOCK and BMAL1 induced transcriptional activation via the *Nlgn1* promoter sequence that contained four E-boxes including a consensus CACGTG, and to a lesser extent via the *Nlgn2* promoter sequence that contained five E-boxes. This may suggest a particular role of the consensus E-box present in the *Nlgn1* fragment but absent from the *Nlgn2* targeted sequence. We indeed reported previously that CLOCK and BMAL1 were binding to a 77 bp DNA fragment containing this consensus E-box in a time-of-day dependent manner in the mouse cerebral cortex (El Helou et al., 2013). Nonetheless, we observed no decrease in transcriptional activation via the *Nlgn1* promoter when mutating the CACGTG into ACCTGG. This exact same mutation was previously shown to reduce by more than half the transcriptional activity of CLOCK and BMAL1 upon a portion of the *Dbp* gene (Rey et al., 2011). Our previous work showed that mutating only two nucleotides of two E-boxes of *Ror γ*

reduced CLOCK/BMAL1 transcriptional activation also by more than 50% (Mongrain et al., 2008), while the work of others revealed that mutating five or six nucleotides from one E-box-like element of *Per2* abolished almost completely CLOCK/BMAL1 steady-state or rhythmic transcriptional activation, respectively (Yoo et al., 2005; Nakahata et al., 2008). The lack of decrease in transcriptional activation of the *Nlgn1* gene after mutating the consensus E-box as well as in combination with the following E-box indicates that other nucleotides of the cloned *Nlgn1* sequence are mostly mediating CLOCK/BMAL1-dependent transcription. This is indeed supported by our observation of significantly decreased transcriptional activation in the triple mutant. Intriguingly, the fact that mutating two E-boxes significantly increased CLOCK/BMAL1-mediated transcriptional activation is puzzling, and may indicate that these specific sites rather play a repressor role in the control of *Nlgn1* expression by core clock transcription factors, which has been proposed previously for other targets (Kondratov et al., 2006; Nguyen et al., 2013).

The repression of *Nlgn1* transcriptional activation by CLOCK/BMAL1 when adding GSK3 β could provide further support to a direct role of the heterodimer in the regulation of *Nlgn1* transcription. Indeed, GSK3 β -dependent BMAL1 phosphorylation drives BMAL1 degradation (Sahar et al., 2010), which would inhibit CLOCK/BMAL1 activity *in vitro*. In addition, a role for GSK3 β in the regulation of *Nlgn1* expression could reveal an intracellular signaling pathway by which NLGN1 amount can be adjusted as a function of synaptic activity since GSK3 β responds to, notably, glutamatergic and dopaminergic transmission (Nishimoto et al., 2008; Beaulieu, 2012). When inhibiting endogenous GSK3 β in COS-7 cells using TDZD-8, we

observed an increasing trend for the CLOCK/BMAL1-dependent transcriptional activation of *Nlgn1*. Higher doses of TDZD-8 could not be used as these decreased cell viability. The lack of strong effect of the inhibitor could reside in low basal GSK3 β activity in COS-7 cells or in too high CLOCK/BMAL1-mediated activation, preventing inhibition by endogenous GSK3 β . Similarly, the lack of significant effect of the inhibitor on overexpressed WT GSK3 β activity may come from saturation due to overexpression. In our study, the transfection of a constitutively active GSK3 β S9A (Stambolic and Woodgett, 1994), ensured maximal inhibition of the CLOCK:BMAL1 dimer but rendered inhibition with TDZD-8 impossible. Therefore, our findings may support that this inhibitor impacts serine 9 to modulate GSK3 β activity as proposed by others (Collino et al., 2008), in parallel to supporting a role for molecular clock components in the regulation of *Nlgn1* gene expression.

We further characterized the role of clock components in the regulation of *Nlgn1* expression using around-the-clock quantification of *Nlgn1* transcripts in the forebrain of *Clock* mutant mice. The expression of specific *Nlgn1* variants was decreased in *Clock* mutant mice, while others appear to show an inverted rhythm in their pattern of expression. This observation is reminiscent of, among others, that of different splice variants of the *Presenilin-2* gene reported to show different rhythms of expression in the liver (Bélanger et al., 2006), an effect that may depend on core clock transcription factors or other circadian regulators. In fact, the expression of specific splicing factors has been shown to be clock-controlled (McGlinchy et al., 2012). In addition, the temperature rhythm was recently shown to importantly influence alternative splicing in the mouse (Preußner et al., 2017), and alterations of

the body temperature rhythm have been reported in mice with the *Clock* mutation (Ochi et al., 2003). Alternatively, *Nlgn1* expression could also be regulated by negative regulators of the clock such as REV-ERB α , whose gene expression is decreased in *Clock* mutant mice (Oishi et al., 2002). Even if we did not observe retinoic acid-related orphan receptor response elements (RORE: binding sites for REV-ERB α) in the promoter of *Nlgn1*, at least when considering 3000 bp preceding the transcription start site, assessing *Nlgn1* gene expression in *RevErba* knockout mice would help understanding the role of clock proteins in the transcriptional regulation of *Nlgns*. In sum, our findings suggest a complex, transcript variant-specific, regulation of *Nlgn1* transcription by CLOCK *in vivo*.

Several circadian studies have shown that rhythmicity in mRNA expression is not always reflected at the protein level and vice versa (Chiang et al., 2014; Mauvoisin et al., 2014; Reddy et al., 2006), which is in line with our observations of changes in the expression of *Nlgn1* transcripts in *Clock* mutant mice that are not paralleled with a change in NLGN1 protein level. Absence of effect at the protein level could reside in low statistical power. Otherwise, given that we made different observations for the expression of the different *Nlgn1* transcript variants, the absence of difference at the protein level likely resides in the incapacity to detect distinct protein isoforms (no isoform-specific antibodies available). In addition, both mRNA expression and protein levels were examined in half brain samples, which may mask effects that would be specific for brain regions or even cell types. Future studies should thus assess the influence of CLOCK, BMAL1 and their homologs on the

expression of different *Nlgn1* variants and isoforms in precise brain areas and cell populations.

In conclusion, our findings support a role for core clock transcription factors in regulating the gene expression of *Nlgn1* in the mouse. Importantly, CLOCK and BMAL1 may not be main transcriptional regulators of *Nlgn1* as implied by moderate transcriptional activation *in vitro* and variant-specific gene expression changes in *Clock* mutant mice. Nevertheless, our results suggest that *Nlgn1* could represent an additional ‘clock-controlled gene’ that would link molecular clock mechanisms to synaptic functioning and plasticity. In fact, NLGN1 has been implicated in synaptogenesis, presynaptic glutamate release, postsynaptic glutamate responses, as well as disorders of the central nervous system such as Alzheimer’s disease (Jung et al., 2010; Kwon et al., 2012; Suzuki et al., 2012; Bie et al., 2014). Therefore, the control of *Nlgn1* expression by clock proteins would provide a route by which molecular clock components can influence these cellular and neuronal functions and dysfunctions.

Acknowledgments

We are thankful to Xuan Ruan, Gaétan Tremblay and Mélanie Welman for technical help with experiments and equipment, and to Aude Villemain for mouse colony management. This research was funded by the Canada Research Chair in Sleep Molecular Physiology (VM), the Canada Research Chair in Molecular Psychiatry (JMB), salary awards from the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to VM and NC, a grant from CIHR to VM, a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to NC, and fellowships from FRQS and NSERC to VM, from NSERC to PGR, from the Université de Montréal to LH, and from the Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal to EKO.

Conflict of interest statement

VM and NC are members of the Editorial Board of the *Journal of Biological Rhythms*. Aside from this, all authors declare no other conflict of interest.

Note

None

References

- Barrow SL, Constable JR., Clark E, El-Sabeawy F, McAllister AK, and Washbourne P (2009) Neuroligin1: a cell adhesion molecule that recruits PSD-95 and NMDA receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis. *Neural Dev* 4(1):17.
- Beaulieu JM (2012) A role for Akt and glycogen synthase kinase-3 as integrators of dopamine and serotonin neurotransmission in mental health. *J Psychiatry Neurosci* 37(1):7-16.
- Bélanger V, Picard N, and Cermakian N (2006) The circadian regulation of Presenilin-2 gene expression. *Chronobiol Int* 23(4):747-766.
- Bie B, Wu J, Yang H, Xu JJ, Brown DL, and Naguib M (2014) Epigenetic suppression of neuroligin 1 underlies amyloid-induced memory deficiency. *Nat Neurosci* 17(2):223-231.
- Blundell J, Blaiss CA, Etherton MR, Espinosa F, Tabuchi K, Walz C, Bolliger MF, Südhof TC, and Powell CM (2010) Neuroligin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior. *J Neurosci* 30(6):2115-2129.
- Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS, and Bradfield CA (2000) Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 103(7):1009-1017.
- Chiang CK, Mehta N, Patel A, Zhang P, Ning Z, Mayne J, Sun WY, Cheng HY, and Figeys D (2014) The proteomic landscape of the suprachiasmatic nucleus clock reveals large-scale coordination of key biological processes. *PLoS Genet* 10(10):e1004695.

- Chih B, Engelman H, and Scheiffele P (2005) Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science* 307(5713):1324-1328.
- Collino M, Thiemermann C, Mastrocola R, Gallicchio M, Benetti E, Miglio G, Castiglia S, Danni O, Murch O, Dianzani C, Aragno M, and Fantozzi R (2008) Treatment with the glycogen synthase kinase-3 β inhibitor, TDZD-8, affects transient cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat hippocampus. *Shock* 30(3):299-307.
- Dardente H, Fortier EE, Martineau V, and Cermakian N (2007) Cryptochromes impair phosphorylation of transcriptional activators in the clock: a general mechanism for circadian repression. *Biochem J* 402(3):525-536.
- DeBruyne JP, Noton E, Lambert CM, Maywood ES, Weaver DR, and Reppert SM (2006) A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron* 50(3):465-477.
- DeBruyne JP, Weaver DR, and Reppert SM (2007) CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat Neurosci* 10(5):543-545.
- Duguay D and Cermakian N (2009) The crosstalk between physiology and circadian clock proteins. *Chronobiol Int* 26(8):1479-1513.
- El Helou J, Bélanger-Nelson E, Freyburger M, Dorsaz S, Curie T, La Spada F, Gaudreault PO, Beaumont É, Pouliot P, Lesage F, Frank MG, Franken P, and Mongrain V (2013) Neuroligin-1 links neuronal activity to sleep-wake regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(24):9974-9979.

- Freyburger M, Pierre A, Paquette G, Bélanger-Nelson E, Bedont J, Gaudreault PO, Drolet G, Laforest S, Blackshaw S, Cermakian N, Doucet G, and Mongrain V (2016) EphA4 is involved in sleep regulation but not in the electrophysiological response to sleep deprivation. *Sleep* 39(3):613-624.
- Garcia JA, Zhang D, Estill SJ, Michnoff C, Rutter J, Reick M, Scott K, Diaz-Arrastia R, and McKnight SL (2000) Impaired cued and contextual memory in NPAS2-deficient mice. *Science* 288(5474):2226-2230.
- Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, and Weitz CJ (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280(5369):1564-1569.
- Giannone G, Mondin M, Grillo-Bosch D, Tessier B, Saint-Michel E, Czöndör K, Sainlos M, Choquet D, and Thoumine O (2013) Neurexin-1 β binding to neuroligin-1 triggers the preferential recruitment of PSD-95 versus gephyrin through tyrosine phosphorylation of neuroligin-1. *Cell Rep* 3(6):1996-2007.
- Guillaumond F, Dardente H, Giguère V, and Cermakian N (2005) Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* 20(5):391-403.
- Harada Y, Sakai M, Kurabayashi N, Hirota T, and Fukada Y (2005) Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 β . *J Biol Chem* 280(36):31714-31721.
- He X, Saint-Jeannet JP, Woodgett JR, Varmus HE, Dawid IB (1995) Glycogen synthase kinase-3 and dorsoventral patterning in *Xenopus* embryos. *Nature* 374(6523):617-622.

- Hogenesch JB, Gu YZ, Jain S, and Bradfield CA (1998) The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(10):5474-5479.
- Jung SY, Kim J, Kwon OB, Jung JH, An K, Jeong AY, Lee CJ, Choi YB, Bailey CH, Kandel ER, and Kim JH (2010) Input-specific synaptic plasticity in the amygdala is regulated by neuroligin-1 via postsynaptic NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(10):4710-4715.
- Ko CH and Takahashi JS (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* 15(suppl_2):R271-R277.
- Kondratov RV, Shamanna RK, Kondratova AA, Gorbacheva VY, and Antoch MP (2006) Dual role of the CLOCK/BMAL1 circadian complex in transcriptional regulation. *FASEB J* 20(3):530-532.
- Kwon HB, Kozorovitskiy Y, Oh WJ, Peixoto RT, Akhtar N, Saulnier JL, Gu C, and Sabatini BL (2012) Neuroligin-1-dependent competition regulates cortical synaptogenesis and synapse number. *Nat Neurosci* 15(12):1667-1674.
- Lavoie J, Hébert M, and Beaulieu JM (2013) Glycogen synthase kinase-3 β haploinsufficiency lengthens the circadian locomotor activity period in mice. *Behav Brain Res* 253:262-265.
- Martinez A, Alonso M, Castro A, Pérez C, and Moreno FJ (2002) First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 β) inhibitors: thiadiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem* 45(6):1292-1299.

- Massart R, Freyburger M, Suderman M, Paquet J, El Helou J, Belanger-Nelson E, Rachalski A, Koumar OC, Carrier J, Szyf M, and Mongrain V (2014) The genome-wide landscape of DNA methylation and hydroxymethylation in response to sleep deprivation impacts on synaptic plasticity genes. *Transl Psychiatry* 4:e347.
- Mauvoisin D, Wang J, Jouffe C, Martin E, Atger F, Waridel P, Quadroni M, Gachon F, and Naef F (2014) Circadian clock-dependent and -independent rhythmic proteomes implement distinct diurnal functions in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(1):167-172.
- McGlincy NJ, Valomon A, Chesham JE, Maywood ES, Hastings MH, and Ule J (2012) Regulation of alternative splicing by the circadian clock and food related cues. *Genome Biol* 13(6):R54.
- Mongrain V, Ruan X, Dardente H, Fortier EE, and Cermakian N (2008) Clock-dependent and independent transcriptional control of the two isoforms from the mouse *Rory* gene. *Genes Cells* 13(12):1197-1210.
- Nakahata Y, Yoshida M, Takano A, Soma H, Yamamoto T, Yasuda A, Nakatsu T, and Takumi T (2008) A direct repeat of E-box-like elements is required for cell-autonomous circadian rhythm of clock genes. *BMC Mol Biol* 9:1.
- Nguyen T and Südhof TC (1997) Binding properties of neuroligin 1 and neurexin 1beta reveal function as heterophilic cell adhesion molecules. *J Biol Chem* 272(41):26032-26039.

- Nguyen KD, Fentress SJ, Qiu Y, Yun K, Cox JS, and Chawla A (2013) Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science* 341(6153):1483-1488.
- Nishimoto T, Kihara T, Akaike A, Niidome T, and Sugimoto H (2008) alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate attenuates glutamate-induced caspase-3 cleavage via regulation of glycogen synthase kinase 3beta. *J Neurosci Res* 86(5):1096-1105.
- Ochi M, Sono S, Sei H, Oishi K, Kobayashi H, Morita Y, and Ishida N (2003) Sex difference in circadian period of body temperature in Clock mutant mice with Jcl/ICR background. *Neurosci Lett* 347(3):163-166.
- Oishi K, Miyazaki K, and Ishida N (2002) Functional CLOCK is not involved in the entrainment of peripheral clocks to the restricted feeding: entrainable expression of mPer2 and BMAL1 mRNAs in the heart of Clock mutant mice on Jcl:ICR background. *Biochem Biophys Res Commun* 298(2):198-202.
- Preußner M, Goldammer G, Neumann A, Haltenhof T, Rautenstrauch P, Müller-McNicoll M, and Heyd F (2017) Body temperature cycles control rhythmic alternative splicing in mammals. *Mol Cell* 67(3):433-446.
- Reddy AB, Karp NA, Maywood ES, Sage EA, Deery M, O'Neill JS, Wong GK, Chesham J, Odell M, Lilley KS, Kyriacou CP, and Hastings MH (2006) Circadian orchestration of the hepatic proteome. *Curr Biol* 16(11):1107-1115.
- Rey G, Cesbron F, Rougemont J, Reinke H, Brunner M, and Naef F (2011) Genome-wide and phase-specific DNA-binding rhythms of BMAL1 control circadian output functions in mouse liver. *PLoS Biol* 9(2):e1000595.

- Runkel F, Rohlmann A, Reissner C, Brand SM, and Missler M (2013) Promoter-like sequences regulating transcriptional activity in neurexin and neuroligin genes. *J Neurochem* 127(1):36-47.
- Sahar S, Zocchi L, Kinoshita C, Borrelli E, and Sassone-Corsi P (2010) Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3 β -mediated phosphorylation. *PLoS one* 5(1):e8561.
- Shi S, Hida A, McGuinness OP, Wasserman DH, Yamazaki S, and Johnson CH (2010) Circadian clock gene Bmal1 is not essential; functional replacement with its paralog, Bmal2. *Curr Biol* 20(4):316-321.
- Song JY, Ichtchenko K, Südhof TC, and Brose N (1999) Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(3):1100-1105.
- Stambolic V and Woodgett JR (1994) Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 β in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem J* 303(3):701-704.
- Suzuki K, Hayashi Y, Nakahara S, Kumazaki H, Prox J, Horiuchi K, Zeng M, Tanimura S, Nishiyama Y, Osawa S, Sehara-Fujisawa A, Saftig P, Yokoshima S, Fukuyama T, Matsuki N, Koyama R, Tomita T, and Iwatsubo T (2012) Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron* 76(2):410-422.
- Travnickova-Bendova Z, Cermakian N, Reppert SM, and Sassone-Corsi P (2002) Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(11):7728-7733.

- Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW, and Takahashi JS (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* 264(5159):719-725.
- Xu H, Gustafson CL, Sammons PJ, Khan SK, Parsley NC, Ramanathan C, Lee HW, Liu AC, and Partch CL (2015) Cryptochrome 1 regulates the circadian clock through dynamic interactions with the BMAL1 C terminus. *Nat Struct Mol Biol* 22(6):476-484.
- Yin L, Wang J, Klein PS, and Lazar MA (2006) Nuclear receptor Rev-erb α is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. *Science* 311(5763):1002-1005.
- Yoo SH, Ko CH, Lowrey PL, Buhr ED, Song EJ, Chang S, Yoo OJ, Yamazaki S, Lee C, and Takahashi JS (2005) A noncanonical E-box enhancer drives mouse Period2 circadian oscillations in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(7):2608-2613.

Figure Legends

Figure 1. Transcriptional activation of *Nlgn1* and *Per1* by core clock components. (A) Scheme of the region of the *Nlgn1* gene selected for luciferase assay (-1159 to -190 bp before transcription start site indicated by an arrow) containing four E-boxes including one canonical E-box CACGTG (blue) and three non-canonical E-boxes CANNTG (green, where N corresponds to A, T, C, or G), as well as mutations of four nucleotides in three E-boxes. (B) Transcriptional activation by the heterodimer CLOCK/BMAL1 via the *Nlgn1* and *Per1* gene fragments, and the empty pGL3 vector. The left and right y-axes show the fold induction relative to the negative control without CLOCK and BMAL1 for *Nlgn1* (and empty vector) and *Per1*, respectively. *: $p < 0.05$ and ***: $p < 0.001$ between indicated points or compared to the negative control (same in C and D). Numbers on bars represent n values (same for all figures). (C) Transcriptional activation by CLOCK, BMAL1, and their homologs NPAS2 and BMAL2 via the *Nlgn1* gene fragment. Fold induction are relative to the negative control without CLOCK and BMAL1 (same in D). CLOCK/BMAL1 and NPAS2/BMAL1 conditions significantly differ from all three other conditions ($p < 0.001$). (D) Fold induction of the transcriptional activation of *Nlgn1* with and without mutated E-boxes (mut1 refers to mutant 1 depicted in panel A, mut2 to mutant 2 and mut3 to mutant 3). All CLOCK/BMAL1 conditions significantly differ from their respective negative control ($p < 0.001$).

Figure 2. Transcriptional activation of *Nlgn1* and *Nlgn2* by core clock components.

(A) Scheme of the region of the *Nlgn2* gene cloned for luciferase assay (-1387 to -220 bp before transcription start site indicated by an arrow) containing five non-canonical E-boxes CANNTG (green, where N corresponds to A, T, C, or G). (B) Transcriptional activation by the heterodimer CLOCK/BMAL1 via the *Nlgn1* and *Nlgn2* gene fragments, and the empty pGL2 vector. The left y-axis shows the fold induction relative to the negative control without CLOCK and BMAL1. **: $p < 0.01$ compared to the negative control; ***: $p < 0.001$ between indicated points.

Figure 3. Modulatory role of GSK3 β on transcriptional activation of *Nlgn1*. (A) Fold induction of the transcriptional activation of the *Nlgn1* gene fragment by CLOCK and BMAL1, with and without wild-type GSK3 β (GSK3 β WT) or constitutively active GSK3 β (GSK3 β S9A), expressed relative to the negative control without CLOCK and BMAL1. **: $p < 0.01$ between indicated points; ***: $p < 0.001$ compared to the negative control (same in B). (B) Fold induction of the transcriptional activation of *Nlgn1* gene fragment with CLOCK, BMAL1, GSK3 β WT and GSK3 β S9A exposed to the vehicle PBS or two concentrations of the GSK3 β inhibitor TDZD-8, expressed relative to the negative control without CLOCK and BMAL1 and exposed to PBS. +: $p = 0.056$ between indicated points.

Figure 4. *Nlgn1* mRNA in *Clock* mutant mice. (A) Schematic view of the position of qPCR amplicons (red lines) on the *Nlgn1* mRNA for targeting different transcript variants (Insert A, No insert A, Insert B, No insert B). Insert A is depicted in blue and

insert B in yellow. The question mark inside blue and yellow boxes indicates that the presence and absence of the other insert could not be simultaneously assessed by qPCR because the inserts are separated by more than 300 nucleotides. (B) Relative expression of *Nlgn1* transcripts in the right forebrain of *Clock*^{Δ19/Δ19} mutant mice (n = 3 to 5 per time point) and WT littermates (n = 4 to 5 per time point) at ZT2, ZT8, ZT14 and ZT20. Data are shown once but curves have been double-plotted. Mutant mice are shown in white and WT in black, and white backgrounds indicate the 12-h light periods and grey backgrounds the 12-h dark (same in C). *: p < 0.06 and *: p < 0.05 between WT and mutant mice. The stars on the right of the top two panels are indicative of a significant genotype effect. (C) Relative expression of *Per2* in the right forebrain of *Clock*^{Δ19/Δ19} mutant mice and WT littermates at ZT2, ZT8, ZT14 and ZT20 (n = 5 per genotype per time point). **: p < 0.01 and ***: p < 0.001 between WT and mutant mice.

Figure 5. NLGN1 protein level in *Clock* mutant mice. (A) Representative Western blot showing NLGN1 in the left forebrain of *Clock*^{Δ19/Δ19} mutant mice and WT littermates at ZT2, ZT8, ZT14 and ZT20. The loading control protein Actin is also shown. Note that total NLGN1 level is detected, not the level of the different NLGN1 isoforms (i.e., insert A, no insert A, insert B, no insert B). (B) Quantification of Western blots for NLGN1 in forebrain of *Clock*^{Δ19/Δ19} mutant mice and WT littermates (n = 4 per genotype per time point). Data are shown once but curves have been double-plotted. Mutant mice are shown in white and WT in black, and white backgrounds indicate the 12-h light periods and grey backgrounds the 12-h dark.

Table 1. Primer and probe sequences used for PCR and qPCR.

Gene Symbol	Direction	Sequence 5' to 3'	Accession Number
<i>mNlgn1</i> E-boxes	Forward Reverse	GATTTCTCGAGTGCCAGAGCAGCCCTTCCTC GTAAAGCTTAACTCCCCGGCTGACCCTG	uc008otb.1 (UCSC)
<i>mNlgn1</i> E-box1 mutant	Forward Reverse	CTA ACCTGGG TGTTTCATGGCAC CATGAAACAC CCAGGT TAGAAG	uc008otb.1 (UCSC)
<i>mNlgn1</i> E-box2 mutant	Forward Reverse	CCTGAACT ACCTGGG AGGCA CCTC CCAGGT AGTTCAGGTTC	uc008otb.1 (UCSC)
<i>mNlgn1</i> E-box3 mutant	Forward Reverse	GGATATAAATA ACCTGGT TCTG CAGAA CCAGGT TATTTATATCC	uc008otb.1 (UCSC)
<i>mNlgn2</i> E-boxes	Forward Reverse	CCACCCGGGCAACTACAACCCCCCTTCAG GAACTCGAGGAGAGAATGAGATAGACAAGG	uc007jrw.1 (UCSC)
<i>mNlgn1A</i>	Foward Reverse Probe	ACGGTGCTGAAGATGAAG CAGTACCTTCCATGTAAGAG TCCCAAACCAGTGATGGTGTACATCCA	NM_001163387 (RefSeq)
<i>mNlgn1NA</i>	Foward Reverse Probe	GGATGTGGTTTCATCATAC TGTCCCGAATATCATCTTC TCCAAGACCAGAGTGAAGACTGTC	NM_001163387 (RefSeq)
<i>mNlgn1B</i>	Foward Reverse Probe	GGTAACCGTTGGAGCAATTCA CCAGCTGGAAAGGGCTGTT CCAAAGGACTTTTTCAACGAGCAATAGCTCA	NM_001163387 (RefSeq)
<i>mNlgn1NB</i>	Foward Reverse Probe	CACTGTGTTTGGATCAGG AAAAGTCCTTCAGAATAATGGG GGTTCATGTGTCAACCTGCTGACT	NM_001163387 (RefSeq)
<i>mGusB</i>	Foward Reverse Probe	ACGGGATTGTGGTCATCGA TGACTCGTTGCCAAAACCTCTGA AGTGTCCCGGTGTGGGCATTGTG	NM_010368 (RefSeq)
<i>mRps9</i>	Foward Reverse Probe	GACCAGGAGCTAAAGTTGATTGGA TCTTGGCCAG GGTAACCTTGA AAACCTCACGTTTGTTCGGAGTCCATACT	NM_029767 (RefSeq)
<i>mTbp</i>	Foward Reverse Probe	TTGACCTAAAGACCATTGCACTTC TTCTCATGATGACTGCAGCAAA TGCAAGAAATGCTGAATATAATCCCAAGCG	NM_013684 (RefSeq)
<i>mPer2</i>	Forward Reverse Probe	ATGCTCGCCATCCACAAGA GCGGAATCGAATGGGAGAAT ATCCTACAGGCCGGTGGACAGCC	NM_011066 (RefSeq)

mNlgn1, *mNeurologin-1*; *mNlgn2*, *mNeurologin-2*; *mNlgn1A*, *mNeurologin-1* with insert A; *mNlgn1NA*, *mNeurologin-1* without insert A; *mNlgn1B*, *mNeurologin-1* with insert B; *mNlgn1NB*, *mNeurologin-1* without insert B; *mGusB*, *mGlucuronidase beta*; *mRps9*, *mRibosomal protein S9*; *mTbp*, *mTATA box binding protein*; *mPer2*, *mPeriod2*.

Figure 1

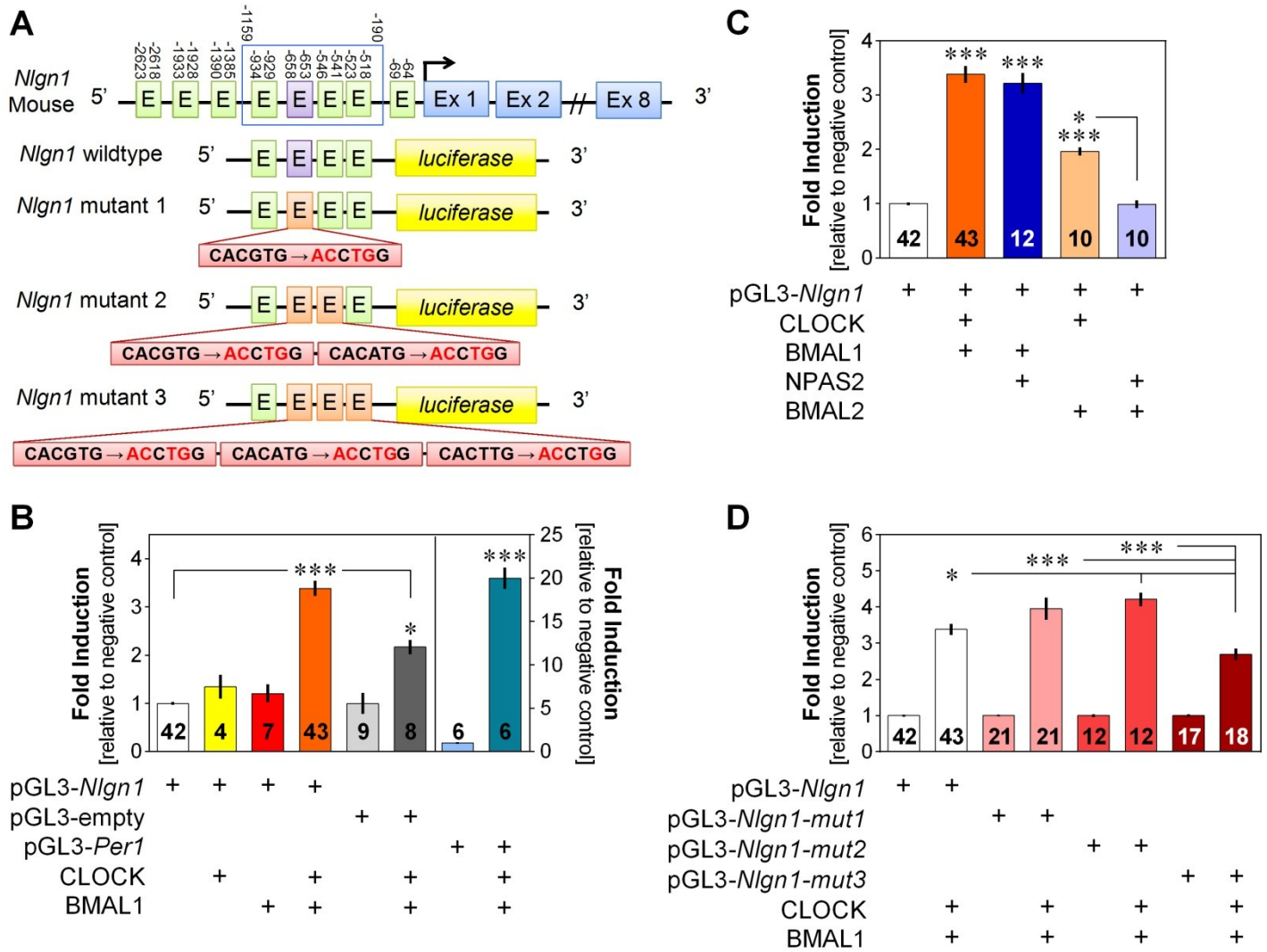


Figure 2

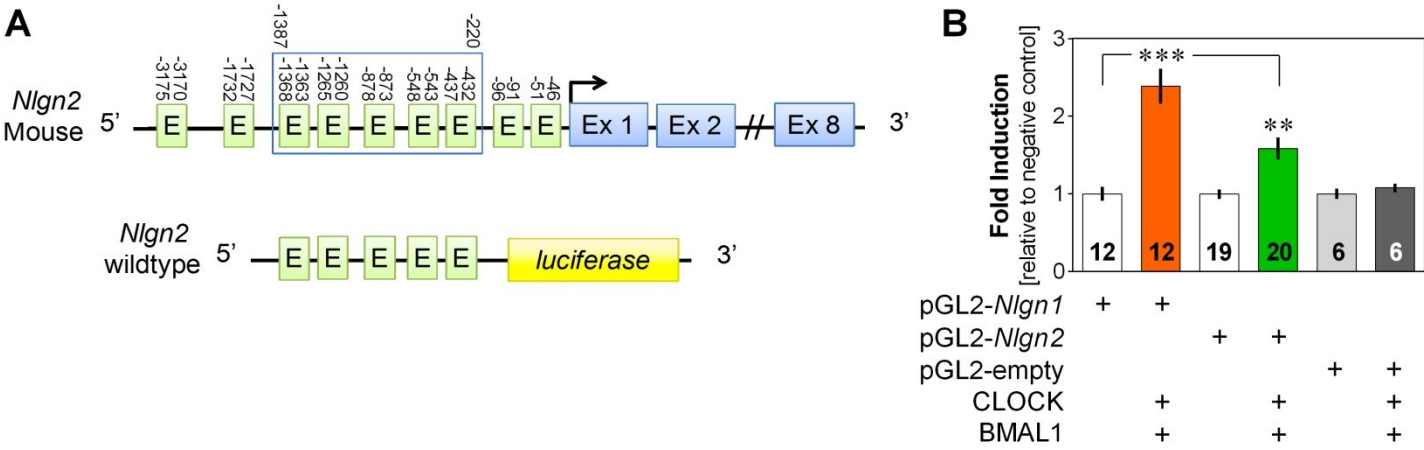


Figure 3

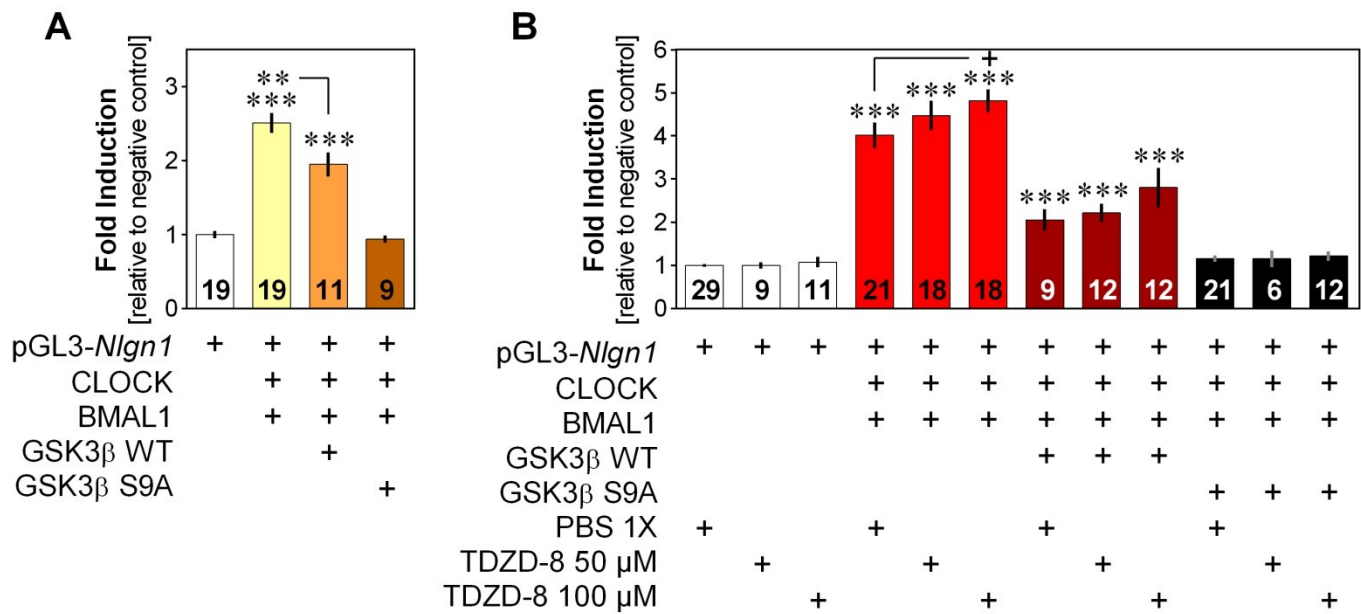


Figure 4

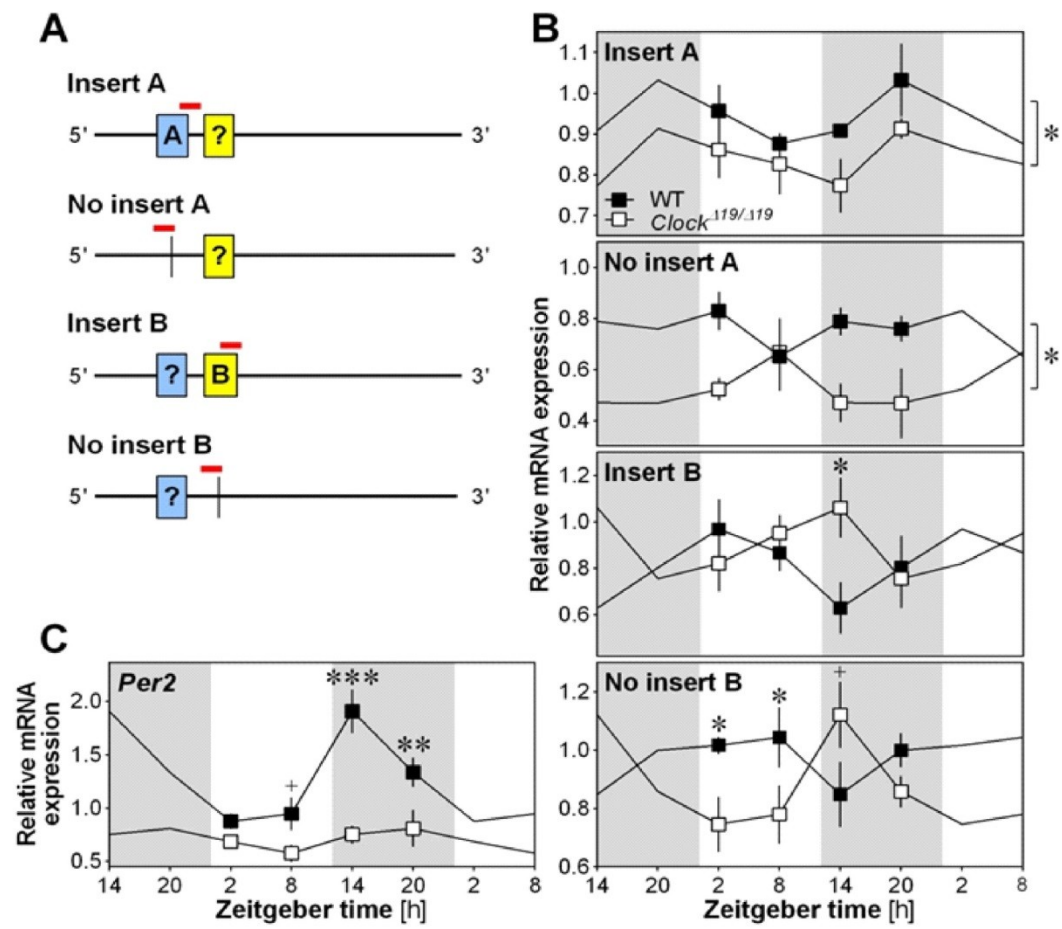
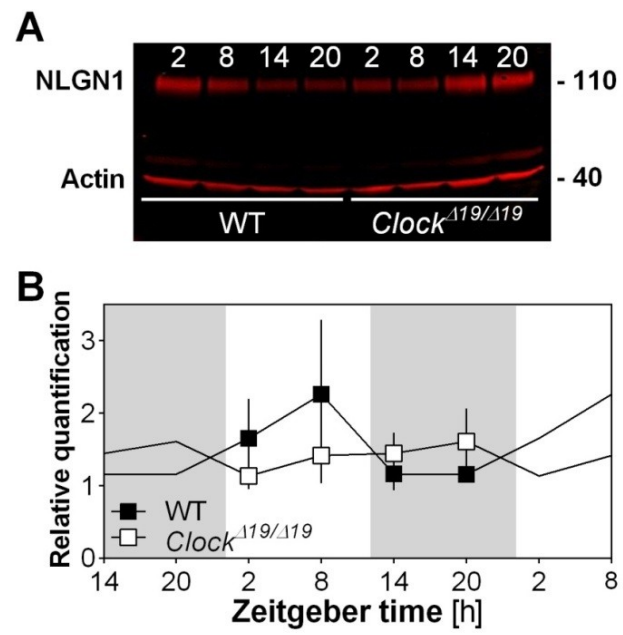


Figure 5



Chapitre 4 : Discussion

4.1 Résumé des résultats

Dans ce projet de maîtrise, les résultats obtenus supportent que les facteurs de transcription de l'horloge sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle du gène *Nlgn1*. Nous avons d'abord observé que CLOCK et BMAL1, ainsi que des combinaisons impliquant leurs homologues NPAS2 ou BMAL2, respectivement, activent la transcription d'une séquence d'intérêt du promoteur de *Nlgn1*. Par la suite, nous avons montré que GSK3 β diminue l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1* par CLOCK et BMAL1, et que cet effet n'est pas renversé par l'inhibiteur de GSK3 β TDZD-8. En ce qui concerne la mutation des E-boxes de la région d'intérêt du promoteur de *Nlgn1*, la diminution attendue de l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1* n'a été observée qu'avec un triple mutant, alors qu'un effet inverse a plutôt été constaté avec un double mutant. Finalement, une perturbation de l'expression des niveaux d'ARN messager de différents variants de transcription de *Nlgn1*, mais pas de protéine, a été observée chez des souris *Clock* mutantes.

4.2 Régulation de Neuroligine-1 par CLOCK et BMAL1

Tout d'abord, nos résultats *in vitro* ont montré que les protéines CLOCK et BMAL1, ensemble, activent la transcription d'une séquence d'intérêt du promoteur de *Nlgn1*. Cette séquence d'intérêt clonée pour l'étude comprend quatre E-boxes

(CANNTG), dont un E-box consensus CACGTG situé à 653 pb avant le site d'initiation de la transcription. Il a déjà été montré que CLOCK et BMAL1 lient une séquence contenant cet E-box consensus d'une manière dépendante du temps du jour (El Helou et al., 2013). Nous avons donc entamé l'étape suivante qui est de vérifier si cette liaison aux E-boxes induit une activation transcriptionnelle du gène *Nlgn1*, cloné dans le plasmide pGL3-Basic. Comme anticipé, une induction de la transcription de *Nlgn1* par ces deux facteurs de transcription a été observée (3.4 fois), ce qui est significativement plus élevé que ce qui est observé pour CLOCK/BMAL1 avec pGL3-Basic vide, suggérant ainsi que CLOCK et BMAL1 sont impliquées dans la régulation génique de *Nlgn1*. De plus, nos essais *in vitro* utilisant seulement CLOCK ou BMAL1 seuls n'ont montré aucune activation de la transcription de *Nlgn1*. Ces résultats confirment l'importance du dimère CLOCK/BMAL1 dans la transcription de leurs gènes cibles. D'ailleurs, un construit plasmidique contenant une portion du promoteur de *Per1* a été utilisé comme contrôle positif, puisqu'il a été montré que ce gène de l'horloge est régulé par le dimère CLOCK et BMAL1 et qu'il fait partie de la boucle de rétroaction impliquée dans la régulation des rythmes circadiens (Gekakis et al., 1998; Ko et Takahashi, 2006). Comme attendu, une très haute induction transcriptionnelle de *Per1* par CLOCK/BMAL1 a été observée (20 fois).

L'utilisation du plasmide pGL3-Basic vide avec CLOCK et BMAL1 a montré une induction d'environ 2.2 fois, ce qui est tout de même significativement plus bas que l'induction observée avec *Nlgn1* (3.4 fois). Cette activation du plasmide vide peut être causée par la présence de trois E-boxes contenus dans une région de 225 pb en

amont du gène luciférase, en l'absence d'insert. Afin de valider l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1* par CLOCK et BMAL1, un autre plasmide, ne montrant aucune activation par CLOCK/BMAL1 lorsque vide, a été utilisé; le pGL2-Basic. Aussi, pour vérifier si cette régulation transcriptionnelle s'applique aussi à d'autres membres de la famille des *Nlgns*, une région du promoteur de *Nlgn2*, dont la protéine se situe majoritairement aux synapses inhibitrices GABAergiques (Varoqueaux et al., 2004), a été choisie pour tester l'induction de sa transcription par CLOCK et BMAL1. Cette région d'intérêt clonée pour l'étude dans pGL2-Basic contient cinq E-boxes non-consensus (CANNTG) et se situe proche du site d'initiation de la transcription. Les résultats des essais ont montré une induction transcriptionnelle de *Nlgn2* de l'ordre de 1.6 fois. Cette induction est toutefois significativement moins élevée que celle observée pour *Nlgn1* dans le plasmide pGL2-Basic (2.4 fois), ce qui pourrait suggérer un rôle particulier du E-box consensus CACGTG, absent de la région étudiée du promoteur de *Nlgn2*, mais présent dans celle de *Nlgn1*. Il est aussi possible que d'autres régions du promoteur de *Nlgn2*, et de *Nlgn1*, puissent induire une plus haute activation transcriptionnelle par les différentes combinaisons et nombres de E-boxes s'y trouvant (tel que des E-boxes se trouvant en amont des régions étudiées, ainsi que dans les introns). De plus, plusieurs études montrent que, autres les séquences CANNTG et consensus CACGTG, CLOCK et BMAL1 lient aussi plusieurs séquences "E-box-like" qui participent aussi à la régulation de divers gènes de l'horloge. Ces autres séquences incluent CACGTT (Yoo et al., 2005); CCAATG, CATTGG, AACGTG (Hatanaka et al., 2010; Rey et al., 2011); des E-boxes tandems séparés par 6 ou 7 pb (Nakahata et al., 2008; Rey et al., 2011); et mêmes

des séquences formées de sept nucléotides au lieu de six, AACGTGA et CATGTGA, ont été identifiées (Wang et al., 2013). Cependant, ces séquences “E-box-like” n’ont pas été trouvées dans les régions du promoteur *Nlgn1* et *Nlgn2* étudiées ici.

Ainsi, les résultats obtenus confirment notre hypothèse qui est que CLOCK et BMAL1 induisent une activation transcriptionnelle de *Nlgn1*. En plus de ce gène, nous avons aussi montré que le dimère CLOCK/BMAL1 induit aussi l’activation transcriptionnelle, bien que plus petite, d’un autre membre de la famille des NLGNs, le gène *Nlgn2*. Ces résultats nous ont donc mené à tester l’impact des homologues de CLOCK et BMAL1, NPAS2 et BMAL2, respectivement, sur la régulation transcriptionnelle de *Nlgn1*.

4.3 Régulation de Neuroligine-1 par NPAS2 et BMAL2

Il a été montré que NPAS2 est un homologue de CLOCK qui lie son partenaire BMAL1 (Garcia et al., 2000), et que cette protéine compense *in vivo* les fonctions circadiennes et transcriptionnelles de CLOCK en son absence (DeBruyne et al., 2006; DeBruyne et al., 2007). Il a aussi été montré que BMAL2 est un homologue de BMAL1 qui lie son partenaire CLOCK ou NPAS2 (Shi et al., 2010), mais que contrairement à NPAS2, BMAL2 ne semble pas avoir une aussi grande fonction compensatrice circadienne et transcriptionnelle pour son homologue BMAL1 (Bunger et al., 2000; Shi et al., 2010; Xu et al., 2015). Suite à ces études, nous avons trouvé intéressant de tester *in vitro* la substitution de CLOCK et/ou BMAL1 par leur

homologue respectif et de mesurer l'impact de ces combinaisons sur l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1*.

Nos résultats d'essais luciférase avec le plasmide pGL3-Basic montrent que la combinaison NPAS2/BMAL1 mène à une activation transcriptionnelle de *Nlgn1* de l'ordre de 3.2 fois, ce qui est similaire à ce qui est obtenu avec le dimère CLOCK/BMAL1 (3.4 fois). Ce résultat appuie les études *in vivo* montrant un rôle compensateur de NPAS2 en l'absence de CLOCK (DeBruyne et al., 2006; DeBruyne et al., 2007). De plus, NPAS2 ne fait pas que compenser lorsque CLOCK est absente, mais participe aussi à l'activité transcriptionnelle sur certains gènes de l'horloge lorsque CLOCK est présente et fonctionnelle. En effet, il a été montré qu'une privation de sommeil mène à un détachement des facteurs NPAS2 et BMAL1, et non CLOCK, d'une région du promoteur du gène *Per2* enrichie de séquences E-boxes et "E-box-like" (Mongrain et al., 2011). Aussi, suite à une privation de sommeil, l'expression normalement élevée de *Per2* chez des souris normales est diminuée chez des souris *Npas2* KO (Franken et al., 2006). Ces données suggèrent l'importance du rôle de NPAS2 dans l'activité transcriptionnelle sur certains gènes de l'horloge.

Par la suite, nos résultats *in vitro* concernant les autres combinaisons de facteurs montrent que lorsque le dimère CLOCK/BMAL2 est testé, une activation transcriptionnelle de *Nlgn1* est observée (2 fois), alors qu'aucune induction de transcription n'est observée avec le dimère NPAS2/BMAL2. Bien que le dimère CLOCK/BMAL2 mène à une induction (2 fois), celle-ci est toutefois plus faible que celle observée avec CLOCK/BMAL1 (3.4 fois) ou NPAS2/BMAL1 (3.2 fois). Ces

résultats concordent avec des données *in vitro* montrant que le complexe CLOCK/BMAL2 induit une plus faible activation transcriptionnelle pour les gènes *Per1* et *Per2* (Dardente et al., 2007; Sasaki et al., 2009), alors que le dimère NPAS2/BMAL2 n'active pas la transcription de *Per1* (Dardente et al., 2007). Structuellement parlant, NPAS2 partage une grande homologie avec CLOCK. Leur domaine bHLH, important pour leur dimérisation et liaison à l'ADN, partage 84% d'homologie, tandis que l'homologie est à 65% pour le domaine PAS-A, et 94% pour le domaine PAS-B (King et al., 1997). Si l'on compare BMAL2 à BMAL1, ils partagent 69% d'homologie au domaine bHLH, 79% au domaine PAS-A, et 71% au domaine PAS-B (King et al., 1997). Cette plus grande homologie entre CLOCK et NPAS2 pourrait contribuer au maintien de l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1* lorsque le dimère CLOCK/BMAL1 est remplacé par NPAS2/BMAL1. Mais puisque l'homologie est généralement moins grande entre BMAL1 et BMAL2, cela pourrait contribuer à la baisse de l'induction transcriptionnelle observée lorsque BMAL1 est remplacée par BMAL2 (CLOCK/BMAL2), et à la disparition de cette induction lorsque BMAL1 et CLOCK sont remplacées par NPAS2 et BMAL2. Aussi, BMAL1 est hautement conservée à travers différentes espèces, alors que BMAL2 montre plus de divergences, ce qui suggère une fonction plus spécifique pour BMAL1 contrairement à BMAL2 (Okano et al., 2001), et pourrait expliquer en partie la différence d'induction observée lorsque BMAL1 est remplacée par BMAL2.

En somme, l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1* semble requérir la présence de CLOCK, ou NPAS2, avec BMAL1, alors que BMAL2 semble être moins

nécessaire. Ceci suggère que BMAL2 ne ferait possiblement pas partie des facteurs de transcription majeurs impliqués dans l'expression du gène *Nlgn1*.

4.4 Effet de GSK3 β sur la régulation de *Neurologine-1*

Les modifications post-traductionnelles, en particulier la phosphorylation, sont importantes pour contrôler la fonction, la localisation cellulaire, et la dégradation des protéines de l'horloge (Dardente et Cermakian, 2007). Il a été montré que GSK3 β phosphoryle des éléments de l'horloge tels que BMAL1, CRY2, PER2, et REV-ERB α , ce qui mène à différentes conséquences, incluant la dégradation de BMAL1 et CRY2 (Harada et al., 2005; Sahar et al., 2010), la translocation nucléaire de PER2 (Iitaka et al., 2005), ou encore la stabilisation de REV-ERB α (Yin et al., 2006). Aussi, la longueur du rythme circadien intrinsèque de l'activité locomotrice est significativement augmentée chez des souris où GSK3 β est génétiquement diminuée (Lavoie et al., 2013). Puisque ces données suggèrent un rôle modulateur de GSK3 β sur l'activité des protéines de l'horloge, nous avons testé l'impact de cette kinase sur l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1* par le dimère CLOCK/BMAL1. Nous avons utilisé deux formes de GSK3 β : une forme sauvage (GSK3 β WT) et une forme mutée (GSK3 β S9A), où la sérine-9 est remplacée par une alanine, ce qui la rend constitutivement active, puisque la phosphorylation de la sérine-9 inhibe l'activité kinase de GSK3 β (Stambolic et Woodgett, 1994; Beaulieu, 2012).

Nos résultats *in vitro* montrent que suite à l'ajout de GSK3 β WT, l'induction transcriptionnelle initiale de *Nlgn1* est significativement diminuée, alors que l'ajout de

GSK3 β S9A l'abolit complètement. Ces résultats supportent l'implication transcriptionnelle de CLOCK/BMAL1 au gène *Nlgn1* et supportent fortement que GSK3 β module l'activité du dimère (Sahar et al., 2010). En plus de son action sur BMAL1, GSK3 β ciblerait aussi CLOCK. Spengler et collaborateurs en 2009 ont montré que CLOCK possède une région riche en sérines et thréonines, hautement conservée à travers les espèces, qui contient un motif de reconnaissance de GSK3 β (Spengler et al., 2009). CLOCK doit être liée à BMAL1 pour que sa sérine-431 soit phosphorylée, ce qui conduit à la phosphorylation de la sérine-427 par GSK3 β et à la dégradation de CLOCK (Spengler et al., 2009). De plus, un rôle de GSK3 β dans la régulation transcriptionnelle de *Nlgn1* pourrait révéler une voie de signalisation intracellulaire par laquelle les niveaux de NLGN1 varieraient en fonction de l'activité synaptique. En effet, Nishimoto et collaborateurs en 2008 ont montré que GSK3 β répond à la transmission glutamatergique et est inhibée par phosphorylation sur sa sérine-9 lorsque des cellules neuronales sont traitées avec du AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate), ce qui diminue la toxicité cellulaire liée au glutamate (Nishimoto et al., 2008). En contrepartie, de hauts niveaux de glutamate diminuent la phosphorylation de GSK3 β sur sa sérine-9, ce qui la rend active, augmentant ainsi la mort cellulaire (Nishimoto et al., 2008).

Étant donné que GSK3 β est impliquée dans une multitude de voies et de pathologies, plusieurs inhibiteurs ont été et sont actuellement développés à titre de potentiels agents thérapeutiques (Doble et Woodgett, 2003). TDZD-8 (4-benzyl-2-methyl-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione) est un des inhibiteurs de GSK3 β que nous avons testé *in vitro* pour mesurer l'impact de GSK3 β (WT et S9A) sur l'activité

transcriptionnelle de CLOCK/BMAL1 sur *Nlgn1*. Cette molécule synthétique inhibe sélectivement GSK3 β en agissant comme un inhibiteur non-compétitif de la liaison au substrat (Martinez et al., 2002), et augmente la phosphorylation de GSK3 β sur sa sérine-9, ce qui l'inactive (Collino et al., 2008). Étant donné la grande variabilité de concentrations de TDZD-8 utilisées en cultures cellulaires (Barry et al., 2003; Chen et al., 2004; Guzman et al., 2007), nous avons testé différentes concentrations afin de trouver les plus optimales pour nos cellules Cos-7 et notre protocole de transfection cellulaire. Les concentrations de 50 et 100 μ M ont été retenues, car des doses plus basses ne montraient pas d'effet alors que celles plus élevées diminuaient la viabilité des cellules. De plus, la période d'incubation choisie (une heure) a été basée sur des études utilisant ce temps, tels que le montrent les résultats de Cheng et collaborateurs en 2004 où une heure de prétraitement au TDZD-8 élimine la mort cellulaire (via l'inhibition de GSK3 β) dans des cellules SH-SY5Y (Chen et al., 2004). Ce temps d'incubation est compatible avec notre protocole de transfection cellulaire, qui n'aurait pas permis un prétraitement de huit heures et plus tel qu'observé dans certaines études (Guzman et al., 2007; Si et al., 2011; Boren et al., 2017). Un temps d'incubation de quatre heures a aussi été testé, mais aucun changement significatif n'a été observé comparativement à l'incubation d'une heure. Nos résultats montrent une tendance à l'augmentation de la transcription de *Nlgn1* par CLOCK/BMAL1 (sans GSK3 β WT ou S9A) lors de l'ajout du TDZD-8, ce qui suggère une inhibition du GSK3 β endogène. Cette faible augmentation de transcription pourrait s'expliquer par une faible activité basale de GSK3 β dans les cellules COS-7 comparativement à l'activation médiée par CLOCK et BMAL1, puisque c'est des vecteurs qui ont été

transfectés pour surexprimer les protéines à de hauts niveaux. Lorsque TDZD-8 est ajouté à la condition CLOCK/BMAL1 et GSK3 β S9A, aucune restauration de la transcription de *Nlgn1* n'est observée, ce qui est attendu étant donné la mutation de la sérine-9 de GSK3 β par une alanine. Toutefois, l'ajout du TDZD-8 à la condition CLOCK/BMAL1 et GSK3 β WT n'a pas significativement rétabli l'induction de *Nlgn1*, ce qui pourrait être dû à des niveaux surexprimés de GSK3 β WT trop élevés pour observer un effet du TDZD-8.

Ainsi, nos résultats montrent qu'en présence de GSK3 β WT, l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1* par CLOCK/BMAL1 est significativement diminuée, alors que la présence de GSK3 β S9A l'abolit complètement. Ces résultats appuient notre hypothèse qui implique un rôle modulateur de GSK3 β dans la régulation transcriptionnelle de *Nlgn1* par le dimère. De plus, l'ajout du TDZD-8 augmente faiblement l'induction transcriptionnelle en présence du dimère, suggérant un effet sur le GSK3 β endogène, mais ne rétablit pas l'activation transcriptionnelle en présence de GSK3 β WT ou S9A, ce qui suggère possiblement des niveaux d'expression trop élevés de la kinase WT pour observer un effet significatif de TDZD-8.

4.5 Effet des mutations des E-boxes sur l'expression de *Neurologine-1*

Suite à l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1* par le dimère CLOCK et BMAL1, ainsi que l'homologue NPAS2, et le rôle modulateur de GSK3 β sur cette régulation, nous nous sommes interrogés sur la séquence nucléotidique exacte requise afin que cette activation transcriptionnelle ait lieu. Nous savons que le dimère CLOCK/BMAL1

se lie à des E-Boxes, CANNTG (Massari et Murre, 2000), et que le gène *Nlgn1* possède plusieurs E-boxes conservés à travers les espèces (El Helou et al., 2013). Il a aussi été montré que CLOCK et BMAL1 lient une séquence contenant un E-box consensus CACGTG retrouvé dans le promoteur de *Nlgn1* (El Helou et al., 2013), et nos présents résultats révèlent que le dimère active la transcription de ce gène via une région contenant cet E-box consensus et trois autres E-boxes non consensus. Nous avons donc décidé d'effectuer des mutations à certains de ces E-boxes afin de trouver quels nucléotides sont nécessaires à l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1*. Il a été montré que la mutation de seulement deux nucléotides dans deux E-boxes consensus (CACGTG → CTCGAG) du promoteur de *Rory* diminue de 62% l'activité transcriptionnelle de CLOCK/BMAL1 (Mongrain et al., 2008). D'autres études montrent que la mutation de cinq (CACGTT → GCTAGT) ou six (CACGTT → GCTAGG) nucléotides d'une séquence "E-box-like" se trouvant dans une région du promoteur de *Per2* abolie presque entièrement l'activation transcriptionnelle ponctuelle et rythmique de ce gène par CLOCK et BMAL1 (Yoo et al., 2005; Nakahata et al., 2008). Rey et collaborateurs en 2011 ont montré que deux séquences E-box CACGTG en tandem, séparées par seulement six ou sept nucléotides induisent une plus grande activation transcriptionnelle que des E-boxes qui ne sont pas en tandem, et que muter un des E-box en tandem (CACGTG → ACCTGG) induit une réduction significative de la transcription des gènes étudiés *in vitro* (Rey et al., 2011). Nous nous sommes donc basés sur la mutation utilisée dans cette dernière étude pour créer trois construits : un construit contenant un E-box consensus muté (CACGTG → ACCTGG) et trois E-boxes non-mutés, un autre

construit avec le E-box consensus et un E-box non-consensus mutés et deux E-boxes non-mutés, ainsi qu'un troisième construit contenant le E-box consensus et deux E-boxes non-consensus mutés et un E-box non-muté.

Nos résultats indiquent que l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1* par CLOCK/BMAL1 n'est pas diminuée lorsque le E-box consensus est muté, ce qui diffère de ce qui est observé dans Rey et al. (2011). Cette différence pourrait en partie être expliquée par le fait que nous n'avons pas de E-boxes en tandem dans notre région d'intérêt, ce qui pourrait avoir influencé la différence d'induction observée avant et après la mutation du E-box dans l'étude de Rey et collaborateurs. Aussi, lorsque seulement un des deux E-boxes consensus de la région étudiée du promoteur de *Rory* est muté, seulement 16% de réduction de l'induction est observée, comparativement à 62% de réduction lorsque les deux E-boxes de la région étudiée sont mutés (Mongrain et al., 2008). De plus, chez le poisson-zèbre, quatre E-boxes, dont deux consensus et deux non-consensus, ont été trouvés dans le promoteur du gène *Zfper4*, homologue du gène *Per1*, dont l'expression est réprimée par la lumière (Vallone et al., 2004). Lorsque des mutations sont introduites dans ces E-boxes, un effet additif des mutations montre une diminution de la répression du gène, ainsi que de la rythmicité, qui atteint son maximum lorsque les quatre E-boxes sont mutés (Vallone et al., 2004). Il se pourrait donc qu'en mutant un autre E-box, une réduction de la transcription de *Nlgn1* soit observée. Contre toute attente, l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1* par CLOCK/BMAL1 lorsque le E-box consensus et un E-box non-consensus sont mutés n'a pas été diminuée. Au contraire, il y a eu une augmentation significative de la transcription de *Nlgn1* (4.2

fois) comparativement au construit non-muté (3.4 fois). Finalement, lorsqu'une troisième mutation a été introduite au double mutant, générant le triple mutant, une baisse significative de l'induction de *Nlgn1* a été observée (2.7 fois) comparativement au construit WT (3.4 fois) et aux construits simple (4 fois) et double mutants (4.2 fois). Le fait que l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1* diminue seulement suite à une triple mutation des E-boxes suggère fortement que le troisième E-box muté de la région du promoteur étudiée joue un rôle important dans la transcription médiée par CLOCK/BMAL1. Aussi, il se pourrait que le dernier E-box non-muté ainsi que d'autres séquences que les E-boxes, différentes des "E-box-like", se trouvant possiblement dans la région étudiée puissent participer à l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1* par le dimère. Finalement, puisqu'une augmentation de l'induction transcriptionnelle de *Nlgn1* a été observée avec le double mutant, une autre possibilité serait que les deux E-boxes mutés joueraient un rôle répresseur dans le contrôle de l'expression de *Nlgn1* par les facteurs de l'horloge. Cette possibilité a déjà été observée dans d'autres études où CLOCK et BMAL1 jouent un rôle répresseur pour d'autres gènes cibles (Kondratov et al., 2006; Nguyen et al., 2013). En effet, il a été montré que CLOCK et BMAL1, en combinaison avec CRY1, répriment l'expression du gène *Cry1* (Kondratov et al., 2006); alors que l'absence de *Bmal1* dans des cellules myéloïdes augmente l'expression de chimiokines et de monocytes Ly6C^{hi}, et altère leur rythme d'expression diurne, ce qui augmente l'inflammation et la prédisposition à des risques d'infection (Nguyen et al., 2013).

En somme, nos résultats confirment partiellement notre hypothèse voulant que la mutation de E-boxes dans la région étudiée du promoteur de *Nlgn1* réduise

l'induction transcriptionnelle par CLOCK/BMAL1. La réduction escomptée a été observée seulement avec le construit triple mutant, alors que, au contraire, la double mutation a mené plutôt à une augmentation de l'expression de *Nlgn1*. Il serait intéressant, comme étape suivante, de créer un construit quadruple mutant pour tester l'effet du quatrième mutant sur la régulation transcriptionnelle de *Nlgn1* médiée par les facteurs CLOCK/BMAL1.

4.6 Effet de CLOCK mutante sur les niveaux d'ARN messenger *Neuroligine-1*

Suite aux expériences *in vitro* montrant que CLOCK et BMAL1 activent la transcription du gène *Nlgn1*, nous nous sommes penchés sur l'effet *in vivo* d'une mutation de la protéine CLOCK sur les niveaux d'ARN messenger de *Nlgn1* à différents temps du jour. Pour ce faire, des souris *Clock* mutantes ont été utilisées (Vitaterna et al., 1994; King et al., 1997). Ces souris portent une mutation de type dominant-négative aux deux allèles du gène *Clock*, ce qui produit une protéine CLOCK non-fonctionnelle pouvant former un dimère avec BMAL1 et lier ses gènes cibles, mais sans pouvoir activer leur transcription (King et al., 1997; Gekakis et al., 1998; Jin et al., 1999; Ko et Takahashi, 2006). Les effets de cette mutation ont été mesurés sur les différents variants de transcription de *Nlgn1* dans le prosencéphale droit des souris. En effet, comme décrit dans l'introduction (section 1.1.2), l'épissage alternatif de *Nlgn1* produit quatre variants de transcription incluant la présence ou l'absence de deux inserts : *Nlgn1* avec insert A et insert B (*Nlgn1AB*), *Nlgn1* avec insert A uniquement (*Nlgn1A*), *Nlgn1* avec insert B uniquement (*Nlgn1B*), et *Nlgn1*

sans inserts (Ichtchenko et al., 1995; Chih et al., 2006). Il est important de tester tous les variants, car ceux-ci possèdent différents rôles au niveau des fonctions et de la localisation de NLGN1. En effet, les variants possédant l'insert A, sans insert B, localisent NLGN1 aux synapses inhibitrices, alors que les variants possédant l'insert B, avec ou sans insert A, localisent la protéine aux synapses excitatrices (Chih et al., 2006). De plus, l'interaction de NLGN1 avec sa partenaire synaptique, NRXN, dépend aussi de la présence des inserts (Ichtchenko et al., 1995; Boucard et al., 2005). Puisque l'expression du gène *Nlgn1* semble être régulée par les protéines de l'horloge CLOCK/BMAL1 *in vitro*, nous avons donc émis comme hypothèse que les niveaux d'ARN messager de *Nlgn1* chez les souris *Clock* mutantes seront diminués, puisque la transcription par le dimère ne pourra avoir lieu.

Nos résultats *in vivo* montrent que certains variants de *Nlgn1* présentent une diminution de leur expression, alors que d'autres montrent une inversion de leur rythme d'expression. Les variants transcriptionnels avec ou sans insert A affichent une diminution significative de leur niveau d'expression chez les souris mutantes. Les variants possédant l'insert B ne présentent pas de différence quant au niveau de leur expression, sauf pour le début de la période de noirceur (ZT14), équivalent au niveau d'expression le plus bas chez les souris contrôles, qui affiche un niveau d'expression significativement plus élevé. Cette apparente inversion du rythme d'expression est aussi observée pour le variant ne possédant pas l'insert B, où l'expression durant la période de lumière est significativement plus basse que celle des souris contrôles, et où l'expression en début de période de noirceur affiche une tendance à être plus élevée que l'expression observée chez les souris contrôles. Nous avons aussi testé

l'effet de la mutation de CLOCK sur les niveaux d'expression du gène *Per2* comme contrôle, puisque c'est un gène de l'horloge régulé par le dimère CLOCK/BMAL1 (Ko et Takahashi, 2006). Il n'a donc pas été surprenant de constater que la mutation de CLOCK a diminué les niveaux d'expression et aboli le rythme d'expression de ce gène, qui normalement affiche un pic d'expression en début de période de noirceur (ZT14), supportant ainsi que CLOCK est un régulateur transcriptionnel majeur de *Per2*.

Des variations observées dans l'expression de différents transcrits, tel que pour *Nlgn1*, ont aussi été observées chez d'autres gènes, tel que *Presenilin-2*, un gène codant pour une protéine de signalisation et qui est régulé par les facteurs de l'horloge CLOCK et BMAL1 (Bélanger et al., 2006). *Presenilin-2* produit trois variants transcriptionnels qui ont été quantifiés dans des foies de souris. Deux de ces transcrits présentent un rythme circadien clair, alors que l'expression du troisième n'est pas rythmique et ne suit pas les deux autres (Bélanger et al., 2006). De plus, il a été montré que l'épissage alternatif est régulé par des mécanismes circadiens de façon tissu-dépendante, et influencé par des stimuli circadiens tel que l'ingestion de nourriture (McGlinchy et al., 2012), suggérant ainsi l'implication des facteurs de l'horloge ou d'autres régulateurs circadiens. Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi certains transcrits de *Nlgn1* maintiennent leur niveau d'expression ou affichent des niveaux plus élevés durant certaines périodes du jour, comparativement aux souris normales, malgré la perte de fonction du dimère CLOCK/BMAL1. Ceci suggère une régulation de ces transcrits par d'autres facteurs circadiens ou une implication de mécanismes de compensation de l'organisme. Un autre élément régulant l'épissage

alternatif pouvant être pertinent à nos observations est le cycle de la température corporelle, qui varie dépendamment du temps du jour, et dont une différence de seulement 1°C est suffisante pour influencer l'épissage alternatif de plusieurs gènes chez la souris (Preußner et al., 2017). Puisque les souris *Clock* mutantes présentent des altérations dans le rythme de température corporelle (Ochi et al., 2003), ceci pourrait s'ajouter aux facteurs influençant les niveaux d'expression des différents variants de *Nlgn1* observés *in vivo*. Aussi, l'expression de *Nlgn1* pourrait également être régulée par des régulateurs négatifs de l'horloge, tel que REV-ERB α dont l'expression génique est diminuée chez les souris *Clock* mutantes (Oishi et al., 2002).

En somme, nos résultats *in vivo* concernant les niveaux d'ARN messager de *Nlgn1* chez des souris *Clock* mutantes montrent différents changements liés aux différents variants de transcription. Des niveaux diminués d'ARN sont observés pour les transcrits possédant ou non l'insert A, alors qu'un rythme inversé d'expression est observé pour les variants avec ou sans l'insert B. Ces observations suggèrent une régulation transcriptionnelle de *Nlgn1* plus complexe *in vivo* que ce qui est observé *in vitro*, puisque c'est seulement une petite partie du promoteur de *Nlgn1* qui est étudiée *in vitro*.

4.7 Effet de CLOCK mutante sur les niveaux de protéine Neuroligine-1

Suite aux altérations observées dans l'expression des variants de transcription de *Nlgn1*, nous avons mesuré les niveaux d'expression de la protéine NLGN1 chez les souris *Clock* mutantes à différents temps du jour. Les protéines ont été extraites

du prosencéphale gauche de ces souris. Étant donné les changements observés au niveau de l'ARN messenger, nous avons émis l'hypothèse que la mutation de *CLOCK* mènera à une diminution d'expression de *NLGN1*. Nos résultats *in vivo* ne montrent cependant aucun changement d'expression de *NLGN1* chez les souris *Clock* mutantes. Ces observations concordent avec le fait que plusieurs études montrent que des changements d'expression de l'ARN messenger ne se reflètent pas nécessairement au niveau de la protéine produite, et vice versa (Reddy et al., 2006; Chiang et al., 2014; Mauvoisin et al., 2014). De plus, une mesure de l'expression globale de *NLGN1* ne discrimine pas entre les niveaux exprimés des différentes isoformes issues des différents transcrits de *Nlgn1*. En effet, il n'existe pas d'anticorps spécifiques aux différentes isoformes de *NLGN1*, donc l'absence de changement global observé peut cacher des variations dans l'expression des différentes isoformes, possiblement liées aux changements observés au niveau des transcrits de *Nlgn1*. Des changements dans l'expression protéique sont en effet observables chez des organismes *Clock* mutants. Allada et collaborateurs en 1998 ont montré une diminution de l'expression protéique, ainsi que de la rythmicité, des protéines de l'horloge PER et TIM chez des drosophiles *Jrk* (ou *dClock*) mutantes, dont le gène muté est un homologue de *Clock* produisant une mutation similaire à celles des souris *Clock* mutantes (Allada et al., 1998). Aussi, chez des souris *Clock* mutantes, les niveaux du neuropeptide Vasopressine sont significativement diminués dans le NSC, concordant avec la diminution de l'expression de son gène (Jin et al., 1999; Silver et al., 1999). De plus, l'expression d'ARN messenger et de protéine *NLGN1* a été mesurée dans des moitiés différentes du prosencéphale. Bien qu'il a

été montré que NLGN1 est exprimée majoritairement dans le cortex, région du cerveau dont la plus grande épaisseur se situe au niveau frontal (Song et al., 1999; *Allen institute for brain science mouse brain atlas*), il est tout de même possible qu'il y ait des différences d'expression liées à la région testée du cerveau (droite ou gauche) et mêmes aux types de cellules s'y trouvant. Finalement, le pouvoir statistique (échantillon de quatre souris) n'est peut-être pas assez élevé pour détecter une différence dans l'expression de NLGN1, surtout si celle-ci est subtile.

Ainsi, nos résultats *in vivo* ne confirment pas notre hypothèse voulant que l'expression de NLGN1 soit affectée par la mutation de *Clock*, puisqu'aucun changement significatif de l'expression de NLGN1 chez les souris *Clock* mutantes n'a été observé. Ce résultat ne suit donc pas les changements observés au niveau des variants transcriptionnels de *Nlgn1*, supportant ainsi une régulation transcriptionnelle et traductionnelle complexes de NLGN1 *in vivo*, ainsi que la possibilité que CLOCK ne soit pas un régulateur majeur de la protéine NLGN1.

4.8 Limites et perspectives

Les résultats de notre étude suggèrent une implication des facteurs de transcription de l'horloge dans la régulation transcriptionnelle de *Nlgn1*. Toutefois, il existe plusieurs limites à notre étude et des étapes futures devront être menées pour répondre à ces limites.

Tout d'abord, pour ce qui est des essais luciférase menés afin de vérifier le rôle modulateur de GSK3 β sur l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1*, une forme

sauvage (GSK3 β WT) et une forme constitutivement active de GSK3 β , dont la sérine-9 a été mutée par une alanine (GSK3 β S9A) (Stambolic et Woodgett, 1994), ont été utilisées. Puisque GSK3 β S9A ne peut pas se faire phosphoryler à son site actif, la sérine-9 (Beaulieu, 2012), et que nos résultats n'ont montré aucun rétablissement de l'induction de *Nlgn1* lorsque nous avons testé TDZD-8 (Collino et al., 2008), il aurait été possible de s'attendre à un rétablissement de l'induction avec la forme GSK3 β WT. Cependant, contrairement à ce qui a été observé lorsque le TDZD-8 a été ajouté avec les conditions CLOCK/BMAL1 (et le GSK3 β endogène), une tendance à l'augmentation de l'induction de *Nlgn1* n'a pas été observée lorsque la forme GSK3 β WT est utilisée. Ce résultat pourrait être dû à de trop hauts niveaux d'expression de GSK3 β WT, ce qui pourrait masquer l'effet du TDZD-8, qui agirait possiblement sur des niveaux physiologiques de GSK3 β . Cette limite peut être contrecarrée en testant des concentrations plus faibles de GSK3 β WT.

Les mutations induites aux E-boxes de notre région étudiée du promoteur de *Nlgn1* ont montré la baisse d'induction transcriptionnelle que nous attendions seulement avec le construit triple mutant. L'étape à suivre serait de produire un construit quadruple mutant afin de tester l'effet du quatrième E-box sur l'induction de *Nlgn1* par CLOCK et BMAL1. Cependant, les mutagenèses et clonages produits jusqu'à date ne nous ont permis d'obtenir que trois des quatre mutations que nous avions visées. Je travaille présentement à muter le E-box restant de notre région d'intérêt de *Nlgn1* pour obtenir une région avec quatre E-boxes mutés. Lorsque la mutation des quatre E-boxes de notre région d'intérêt sera complétée, et si les essais luciférase montrent aussi une baisse de l'induction transcriptionnelle de *Nlgn1*, l'étape

suivante serait de tester séparément le troisième et quatrième E-boxes mutés, afin de vérifier leurs effets individuels sur l'activation transcriptionnelle de *Nlgn1*.

En ce qui concerne les expériences *in vivo*, la mutation introduite chez les souris *Clock* mutantes produit une protéine CLOCK non-fonctionnelle pouvant toutefois lier BMAL1 (Gekakis et al., 1998; Jin et al., 1999; Ko et Takahashi, 2006), ce qui empêche BMAL1 de lier d'autres facteurs tel que NPAS2 et compenser pour la perte de fonction de CLOCK. Il serait intéressant de mesurer les niveaux d'ARN messager et de protéine NLGN1 chez des souris *Clock* KO, où le gène serait désactivé et donc ne produirait pas de protéine CLOCK. Ceci permettrait de vérifier les mécanismes compensatoires, tel que l'implication de NPAS2 (Garcia et al., 2000; DeBruyne et al., 2006; DeBruyne et al., 2007), et de mesurer les niveaux d'expression de *Nlgn1* et NLGN1 comparativement aux niveaux observés chez les souris *Clock* mutantes. Dans le même ordre d'idée, il serait aussi pertinent de mesurer les niveaux d'ARN et de protéine NLGN1 chez des souris *Bmal1* mutantes, et *Bmal1* KO (Bunger et al., 2000). Notre laboratoire a déjà entrepris les premières étapes dans le développement du projet impliquant des souris *Bmal1* mutantes.

Une limite importante lors de la mesure de NLGN1 chez les souris *Clock* mutantes est le fait qu'il n'existe pas d'anticorps spécifique pour les différentes isoformes de NLGN1, ce qui ne permet pas de corréler les changements observés au niveau des différents transcrits de *Nlgn1* avec de potentiels changements d'expression des isoformes de NLGN1 correspondants. Aussi, il serait intéressant de mesurer les niveaux d'ARN et de protéine dans les mêmes régions du cerveau et de tenir compte des différentes populations cellulaires impliquées dans les régions

étudiées, puisque NLGN1 est surtout exprimée à la densité post-synaptique glutamatergique (Song et al., 1999).

4.9 Conclusion

Les résultats de mes travaux de maîtrise et de l'article supportent un rôle des facteurs de transcription de l'horloge dans la régulation transcriptionnelle de *Nlgn1*. Ceci suggère que *Nlgn1* est un potentiel gène sous le contrôle de l'horloge, ce qui tracerait le lien entre les mécanismes moléculaires circadiens et la plasticité synaptique. Cette protéine synaptique jouant un rôle important dans la synaptogénèse, la transmission glutamatergique, le sommeil, et la plasticité synaptique en générale (Jung et al., 2010; Kwon et al., 2012; Suzuki et al., 2012; Wang et al., 2010; Massart et al., 2014; O'Callaghan et al., 2017) est aussi impliquée dans des désordres du système nerveux central, tels que l'Alzheimer et l'autisme (Bie et al., 2014; Nakanishi et al., 2017). L'étude de sa régulation transcriptionnelle est donc primordiale afin d'améliorer nos connaissances sur la relation entre santé mentale et fonctions neuronales, et pour développer des stratégies moléculaires dans le traitement de certains troubles du sommeil et psychiatriques.

Bibliographie

Allada R, White NE, So WV, Hall JC, and Rosbash M (1998) *A mutant Drosophila homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless*. Cell 93(5):791-804.

Allen institute for brain science mouse brain atlas: <http://mouse.brain-map.org/static/atlas>.

Araç D, Boucard AA, Özkan E, Strop P, Newell E, Südhof TC, and Brunger AT (2007) *Structures of neuroligin-1 and the neuroligin-1/neurexin-1 β complex reveal specific protein-protein and protein-Ca²⁺ interactions*. Neuron 56(6):992-1003.

Aschoff J (1965) *Circadian rhythms in man*. Science 148(3676):1427-1432.

Bang ML and Owczarek S (2013) *A matter of balance: role of neurexin and neuroligin at the synapse*. Neurochem res 38(6):1174-1189.

Barry FA, Graham GJ, Fry MJ, and Gibbins JM (2003) *Regulation of glycogen synthase kinase 3 in human platelets: a possible role in platelet function?* FEBS Lett 553(1-2):173-178.

Baudouin S and Scheiffele P (2010) *SnapShot: Neuroligin-neurexin complexes*. Cell 141(5):908, 908 e901.

Beaulieu JM (2012) *A role for Akt and glycogen synthase kinase-3 as integrators of dopamine and serotonin neurotransmission in mental health.* J Psychiatry Neurosci 37(1):7-16.

Bélanger V, Picard N, and Cermakian N (2006) *The circadian regulation of Presenilin-2 gene expression.* Chronobiol Int 23(4):747-766.

Benington JH and Frank MG (2003) *Cellular and molecular connections between sleep and synaptic plasticity.* Prog Neurobiol 69(2):71-101.

Bie B, Wu J, Yang H, Xu JJ, Brown DL, and Naguib M (2014) *Epigenetic suppression of neuroligin 1 underlies amyloid-induced memory deficiency.* Nat Neurosci 17(2):223-231.

Blancar MA and Rutter WJ (1992) *Interaction cloning: identification of a helix-loop-helix zipper protein that interacts with c-Fos.* Science 256(5059):1014.

Bliss TV and Collingridge GL (1993) *A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus.* Nature 361(6407):31-39.

Blundell J, Blaiss CA, Etherton MR, Espinosa F, Tabuchi K, Walz C, Bolliger MF, Sudhof TC, and Powell CM (2010) *Neuroligin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior.* J Neurosci 30(6):2115-2129.

Boren J, Shryock G, Fergis A, Jeffers A, Owens S, Qin W, Koenig KB, Tsukasaki Y, Komatsu S, Ikebe M, Idell S, and Tucker TA (2017) *Inhibition of Glycogen Synthase*

Kinase 3 β Blocks Mesomesenchymal Transition and Attenuates Streptococcus pneumonia–Mediated Pleural Injury in Mice. Am J Pathol 187(11):2461-2472.

Boucard AA, Chubykin AA, Comoletti D, Taylor P, and Sudhof TC (2005) *A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and betaneurexins.* Neuron 48(2):229-236.

Budreck EC, Kwon OB, Jung JH, Baudouin S, Thommen A, Kim HS, Fukazawa Y, Harada H, Tabuchi K, Shigemoto R, Scheiffele P, and Kim JH (2013) *Neuroligin-1 controls synaptic abundance of NMDA-type glutamate receptors through extracellular coupling.* Proc Natl Acad Sci USA 110(2):725-730.

Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS, and Bradfield CA (2000) *Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals.* Cell 103(7):1009-1017.

Chen G, Bower KA, Ma C, Fang S, Thiele CJ, and Luo JIA (2004) *Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death.* FASEB J 18(10):1162-1164.

Cheyne JE and Lohmann C (2014) Chapter Three – The First Hour in the Life of a Synapse: Contact Formation, Partner Selection, and Onset of Function. In Pickel V and Segal M (dir.), *The Synapse: Structure and Function* (1st ed., p. 111-128). Oxford, UK: Academic Press, Elsevier.

Chiang CK, Mehta N, Patel A, Zhang P, Ning Z, Mayne J, Sun WY, Cheng HY, and Figeys D (2014) *The proteomic landscape of the suprachiasmatic nucleus clock reveals large-scale coordination of key biological processes*. PLoS Genet 10(10):e1004695.

Chih B, Engelman H, and Scheiffele P (2005) *Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins*. Science 307(5713):1324-1328.

Chih B, Gollan L, and Scheiffele P (2006) *Alternative splicing controls selective transsynaptic interactions of the neuroligin-neurexin complex*. Neuron 51(2):171-178.

Chubykin AA, Atasoy D, Etherton MR, Brose N, Kavalali ET, Gibson JR, and Südhof TC (2007) *Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2*. Neuron 54(6):919-931.

Collino M, Thiernemann C, Mastrocola R, Gallicchio M, Benetti E, Miglio G, Castiglia S, Danni O, Murch O, Dianzani C, Aragno M, and Fantozzi R (2008) *Treatment with the glycogen synthase kinase-3 β inhibitor, TDZD-8, affects transient cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat hippocampus*. Shock 30(3):299-307.

Dajani R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC, and Pearl LH (2001) *Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 β : structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition*. Cell 105(6):721-732.

Dardente H and Cermakian N (2007) *Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals*. Chronobiol Int 24(2):195-213.

Dardente H, Fortier EE, Martineau V, and Cermakian N (2007) *Cryptochromes impair phosphorylation of transcriptional activators in the clock: a general mechanism for circadian repression*. Biochem J 402(3):525-536.

de la Iglesia HO and Schwartz WJ (2006) *Minireview: timely ovulation: circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis*. Endocrinology 147(3):1148-1153.

DeBruyne JP, Noton E, Lambert CM, Maywood ES, Weaver DR, and Reppert SM (2006) *A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function*. Neuron 50(3):465-477.

DeBruyne JP, Weaver DR, and Reppert SM (2007) *CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock*. Nat Neurosci 10(5):543-545.

Del'Guidice T, Latapy C, Rampino A, Khilghatyan J, Lemasson M, Gelao B, Quarto T, Rizzo G, Barbeau A, Lamarre C, Bertolino A, Blasi G, and Beaulieu JM (2015) *FXR1P is a GSK3 β substrate regulating mood and emotion processing*. Proc Natl Acad Sci USA 112(33):E4610-E4619.

Diekelmann S and Born J (2010) *The memory function of sleep*. Nat Rev Neurosci 11(2):114-126.

Dijk DJ and Czeisler CA (1994) *Paradoxical timing of the circadian rhythm of sleep propensity serves to consolidate sleep and wakefulness in humans*. Neurosci Lett 166(1):63-68.

Doble BW and Woodgett JR (2003) *GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase*. J Cell Sci 116(7):1175-1186.

Duguay D and Cermakian N (2009) *The crosstalk between physiology and circadian clock proteins*. Chronobiol Int 26(8):1479-1513.

El Helou J, Bélanger-Nelson E, Freyburger M, Dorsaz S, Curie T, La Spada F, Gaudreault PO, Beaumont É, Pouliot P, Lesage F, Frank MG, Franken P, and Mongrain V (2013) *Neurologin-1 links neuronal activity to sleep-wake regulation*. Proc Natl Acad Sci USA 110(24):9974-9979.

Eldar-Finkelman H (2002) *Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target*. Trends Mol Med 8(3):126-132.

Franken P, Dudley CA, Estill SJ, Barakat M, Thomason R, O'Hara BF, and McKnight SL (2006) *NPAS2 as a transcriptional regulator of non-rapid eye movement sleep: genotype and sex interactions*. Proc Natl Acad Sci USA 103(18):7118-7123.

Freyburger M, Pierre A, Paquette G, Bélanger-Nelson E, Bedont J, Gaudreault PO, Drolet G, Laforest S, Blackshaw S, Cermakian N, Doucet G, and Mongrain V (2016) *EphA4 is involved in sleep regulation but not in the electrophysiological response to sleep deprivation*. Sleep 39(3):613-624.

Fu Z, Washbourne P, Ortinski P, and Vicini S (2003) *Functional excitatory synapses in HEK293 cells expressing neurologin and glutamate receptors*. J Neurophysiol 90(6):3950-3957.

Gale JE, Cox HI, Qian J, Block GD, Colwell CS, and Matveyenko AV (2011) *Disruption of circadian rhythms accelerates development of diabetes through pancreatic beta-cell loss and dysfunction*. J Biol Rhythms 26(5):423-433.

Garcia JA, Zhang D, Estill SJ, Michnoff C, Rutter J, Reick M, Scott K, Diaz-Arrastia R, and McKnight SL (2000) *Impaired cued and contextual memory in NPAS2-deficient mice*. Science 288(5474):2226-2230.

Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, and Weitz CJ (1998) *Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism*. Science 280(5369), 1564-1569.

Grandin LD, Alloy LB, and Abramson LY (2006) *The social zeitgeber theory, circadian rhythms, and mood disorders: review and evaluation*. Clin Psychol Rev 26(6):679-694.

Grimes CA and Jope RS (2001) *The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling*. Prog Neurobiol 65(4):391-426.

Guilding C and Piggins HD (2007) *Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain?* Eur J Neurosci 25(11):3195-3216.

Guillaumond F, Dardente H, Giguère V, and Cermakian N (2005) *Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors*. J Biol Rhythms 20(5):391-403.

Guzman ML, Li X, Corbett CA, Rossi RM, Bushnell T, Liesveld JL, Hébert J, Young F, and Jordan CT (2007) *Rapid and selective death of leukemia stem and progenitor cells induced by the compound 4-benzyl, 2-methyl, 1, 2, 4-thiadiazolidine, 3, 5 dione (TDZD-8)*. Blood 110(13):4436-4444.

Harada Y, Sakai M, Kurabayashi N, Hirota T, and Fukada Y (2005) *Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 β* . J Biol Chem 280(36):31714-31721.

Hatanaka F, Matsubara C, Myung J, Yoritaka T, Kamimura N, Tsutsumi S, Kanai A, Suzuki Y, Sassone-Corsi P, Aburatani H, Sugano S, and Takumi T (2010) *Genome-wide profiling of the core clock protein BMAL1 targets reveals a strict relationship with metabolism*. Mol Cell Biol 30(24):5636–5648.

Henry JT and Crosson S (2011) *Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context*. Annu Rev Microbiol 65:261-286.

Hirao K, Hata Y, Ide N, Takeuchi M, Irie M, Yao I, Deguchi M, Toyoda A, Sudhof TC, and Takai Y (1998) *A Novel Multiple PDZ Domain-containing Molecule Interacting with N-Methyl-D-aspartate Receptors and Neuronal Cell Adhesion Proteins*. J Biol Chem 273(33):21105-21110.

Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, and Woodgett JR (1993) *Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation*. EMBO J 12(2):803.

Ichtenko K, Hata Y, Nguyen T, Ullrich B, Missler M, Moomaw C, and Südhof TC (1995) *Neurologin 1: a splice site-specific ligand for β -neurexins*. Cell 81(3):435-443.

Ichtenko K, Nguyen T, and Südhof TC (1996) *Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neurologins*. J Biol Chem 271(5):2676-2682.

Iitaka C, Miyazaki K, Akaike T, and Ishida N (2005) *A role for glycogen synthase kinase-3 β in the mammalian circadian clock*. J Biol Chem 280(33):29397-29402.

Irie M, Hata Y, Takeuchi M, Ichtenko K, Toyoda A, Hirao K, Takai Y, Rosahl TW, and Südhof TC (1997) *Binding of neurologins to PSD-95*. Science 277(5331):1511-1515.

Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, De Vries GJ, and Reppert SM (1999) *A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock*. Cell 96(1):57-68.

Jung SY, Kim J, Kwon OB, Jung JH, An K, Jeong AY, Lee CJ, Choi YB, Bailey CH, Kandel ER, and Kim JH (2010) *Input-specific synaptic plasticity in the amygdala is regulated by neurologin-1 via postsynaptic NMDA receptors*. Proc Natl Acad Sci USA 107(10):4710-4715.

Kim E and Sheng M (2004) *PDZ domain proteins of synapses*. Nat Rev Neurosci 5(10):771-781.

Kim J, Jung SY, Lee YK, Park S, Choi JS, Lee CJ, Kim HS, Choi YB, Scheiffele P, Bailey CH, Kandel ER, and Kim JH (2008) *Neurologin-1 is required for normal*

expression of LTP and associative fear memory in the amygdala of adult animals.

Proc Natl Acad Sci USA 105(26):9087-9092.

King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW, and Takahashi JS (1997) *Positional cloning of the mouse circadian clock gene.* Cell 89(4):641-653.

Ko CH and Takahashi JS (2006) *Molecular components of the mammalian circadian clock.* Hum Mol Genet 15 Spec No 2:R271-R277.

Kondratov RV, Shamanna RK, Kondratova AA, Gorbacheva VY, and Antoch MP (2006) *Dual role of the CLOCK/BMAL1 circadian complex in transcriptional regulation.* FASEB J 20(3):530-532.

Kwon HB, Kozorovitskiy Y, Oh WJ, Peixoto RT, Akhtar N, Saulnier JL, Gu C, and Sabatini BL (2012) *Neurologin-1-dependent competition regulates cortical synaptogenesis and synapse number.* Nat Neurosci 15(12):1667–1674.

Larkin A, Chen MY, Kirszenblat L, Reinhard J, Swinderen B, and Claudianos C (2015) *Neurexin-1 regulates sleep and synaptic plasticity in Drosophila melanogaster.* Eur J Neurosci 42(7):2455-2466.

Lavoie J, Hébert M, and Beaulieu JM (2013) *Glycogen synthase kinase-3 β haploinsufficiency lengthens the circadian locomotor activity period in mice.* Behav Brain Res 253:262-265.

Li Y, Zhou Z, Zhang X, Tong H, Li P, Zhang ZC, Jia Z, Xie W, and Han J (2013) *Drosophila neuroligin 4 regulates sleep through modulating GABA transmission*. J Neurosci 33(39):15545-15554.

Lissin DV, Gomperts SN, Carroll RC, Christine CW, Kalman D, Kitamura M, Hardy S, Nicoll RA, Malenka RC, and Von Zastrow M (1998) *Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors*. Proc Natl Acad Sci USA 95(12):7097-7102.

Lu WY, Man HY, Ju W, Trimble WS, MacDonald JF, and Wang YT (2001) *Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons*. Neuron 29(1):243-254.

Malenka RC and Nicoll RA (1999) *Long-term potentiation--a decade of progress?* Science 285(5435):1870-1874.

Maren S (1999) *Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory*. Trends Neurosci 22(12):561-567.

Martinez A, Alonso M, Castro A, Pérez C, and Moreno FJ (2002) *First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) inhibitors: thiadiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease*. J Med Chem 45(6):1292-1299.

Massari ME and Murre C (2000) *Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms*. Mol Cell Biol 20(2):429-440.

Massart R, Freyburger M, Suderman M, Paquet J, El Helou J, Belanger-Nelson E, Rachalski A, Koumar OC, Carrier J, Szyf M, and Mongrain V (2014) *The genome-wide landscape of DNA methylation and hydroxymethylation in response to sleep deprivation impacts on synaptic plasticity genes*. Transl Psychiatry 4(1):e347.

Mauvoisin D, Wang J, Jouffe C, Martin E, Atger F, Waridel P, Quadroni M, Gachon F, and Naef F (2014) *Circadian clock-dependent and -independent rhythmic proteomes implement distinct diurnal functions in mouse liver*. Proc Natl Acad Sci USA 111(1):167-172.

McGlinchy NJ, Valomon A, Chesham JE, Maywood ES, Hastings MH, and Ule J (2012) *Regulation of alternative splicing by the circadian clock and food related cues*. Genome Biol 13(6):R54.

Mion G, Chani M, and Diraison Y (2006) *Pharmacologie du récepteur NMDA*. Cah Anesthesiol 54(1):5-18.

Mondin M, Labrousse V, Hosy E, Heine M, Tessier B, Levet F, Poujol C, Blanchet C, Choquet D, and Thoumine O (2011) *Neurexin-neuroligin adhesions capture surface-diffusing AMPA receptors through PSD-95 scaffolds*. J Neurosci 31(38):13500–13515.

Mongrain V, La Spada F, Curie T, and Franken P (2011) *Sleep loss reduces the DNA-binding of BMAL1, CLOCK, and NPAS2 to specific clock genes in the mouse cerebral cortex*. PLoS One 6(10):e26622.

Mongrain V, Ruan X, Dardente H, Fortier EE, and Cermakian N (2008) *Clock-dependent and independent transcriptional control of the two isoforms from the mouse Ror γ gene*. Genes Cells 13(12):1197-1210.

Nakahata Y, Yoshida M, Takano A, Soma H, Yamamoto T, Yasuda A, Nakatsu T, and Takumi T (2008) *A direct repeat of E-box-like elements is required for cell-autonomous circadian rhythm of clock genes*. BMC Mol Biol 9:1.

Nakanishi M, Nomura J, Ji X, Tamada K, Arai T, Takahashi E, Bućan M, and Takumi T (2017) *Functional significance of rare neuroligin 1 variants found in autism*. PLoS Genet 13(8):e1006940.

Nam CI and Chen L (2005) *Postsynaptic assembly induced by neurexin-neuroligin interaction and neurotransmitter*. Proc Natl Acad Sci USA 102(17):6137-6142.

Nguyen KD, Fentress SJ, Qiu Y, Yun K, Cox JS, and Chawla A (2013) *Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6Chi inflammatory monocytes*. Science 341(6153):1483-1488.

Nguyen T and Südhof TC (1997) *Binding properties of neuroligin 1 and neurexin 1 β reveal function as heterophilic cell adhesion molecules*. J Biol Chem 272(41):26032-26039.

Nishimoto T, Kihara T, Akaike A, Niidome T, and Sugimoto H (2008) *α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate attenuates glutamate-induced*

caspase-3 cleavage via regulation of glycogen synthase kinase 3 β . J Neurosci Res 86(5):1096-1105.

O'Callaghan EK, Roig MNB, and Mongrain V (2017) *Cell adhesion molecules and sleep*. Neurosci Res 116:29-38.

Ochi M, Sono S, Sei H, Oishi K, Kobayashi H, Morita Y, and Ishida N (2003) *Sex difference in circadian period of body temperature in Clock mutant mice with Jcl/ICR background*. Neurosci Lett 347(3):163-166.

Oishi K, Miyazaki K, and Ishida N (2002) *Functional CLOCK is not involved in the entrainment of peripheral clocks to the restricted feeding: entrainable expression of mPer2 and BMAL1 mRNAs in the heart of Clock mutant mice on Jcl:ICR background*. Biochem Biophys Res Commun 298(2):198-202.

Okano T, Sasaki M, and Fukada Y (2001) *Cloning of mouse BMAL2 and its daily expression profile in the suprachiasmatic nucleus: a remarkable acceleration of Bmal2 sequence divergence after Bmal gene duplication*. Neurosci Lett 300(2):111-114.

Plyte SE, Hughes K, Nikolakaki E, Pulverer BJ, and Woodgett JR (1992) *Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development*. Biochim Biophys Acta 1114(2-3):147-162.

Preußner M, Goldammer G, Neumann A, Haltenhof T, Rautenstrauch P, Müller-McNicoll M, and Heyd F (2017) *Body temperature cycles control rhythmic alternative splicing in mammals*. Mol Cell 67(3):433-446.

Rasch B and Born J (2013) *About Sleep's Role in Memory*. Physiol Rev 93(2):681-766.

Reddy AB, Karp NA, Maywood ES, Sage EA, Deery M, O'Neill JS, Wong GK, Chesham J, Odell M, Lilley KS, Kyriacou CP, and Hastings MH (2006) *Circadian orchestration of the hepatic proteome*. Curr Biol 16(11):1107-1115.

Rey G, Cesbron F, Rougemont J, Reinke H, Brunner M, and Naef F (2011) *Genome-wide and phase-specific DNA-binding rhythms of BMAL1 control circadian output functions in mouse liver*. PLoS Biol 9(2):e 1000595.

Runkel F, Rohlmann A, Reissner C, Brand SM, and Missler M (2013) *Promoter-like sequences regulating transcriptional activity in neurexin and neuroligin genes*. J Neurochem 127(1):36-47.

Rusak B and Zucker I (1975) *Biological rhythms and animal behavior*. Annu Rev Psychol 26(1):137-171.

Sahar S, Zocchi L, Kinoshita C, Borrelli E, and Sassone-Corsi P (2010) *Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3 β -mediated phosphorylation*. PLoS One 5(1):e8561.

Sara Y, Biederer T, Atasoy D, Chubykin A, Mozhayeva MG, Südhof TC, and Kavalali ET (2005) *Selective capability of SynCAM and neuroligin for functional synapse assembly*. J Neurosci 25(1):260-270.

Sasaki M, Yoshitane H, Du NH, Okano T, and Fukada Y (2009) *Preferential inhibition of BMAL2-CLOCK activity by PER2 reemphasizes its negative role and a positive role of BMAL2 in the circadian transcription*. J Biol Chem 284(37):25149-25159.

Sato TK, Yamada RG, Ukai H, Baggs JE, Miraglia LJ, Kobayashi TJ, Welsh DK, Kay SA, Ueda HR, and Hogenesch JB (2006) *Feedback repression is required for mammalian circadian clock function*. Nat Genet 38(3):312-319.

Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R, and Serafini T (2000) *Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons*. Cell 101(6):657-669.

Schnell E, Bensen AL, Washburn EK, and Westbrook GL (2012) *Neuroligin-1 overexpression in newborn granule cells in vivo*. PloS one 7(10):e48045.

Schnell E, Long TH, Bensen AL, Washburn EK, and Westbrook GL (2014) *Neuroligin-1 knockdown reduces survival of adult-generated newborn hippocampal neurons*. Front Neurosci 8:71.

Shi S, Hida A, McGuinness OP, Wasserman DH, Yamazaki S, and Johnson CH (2010) *Circadian clock gene Bmal1 is not essential; functional replacement with its paralog, Bmal2*. Curr Biol 20(4):316-321.

Si J, Mueller L, and Collins SJ (2011) *GSK3 inhibitors enhance retinoic acid receptor activity and induce the differentiation of retinoic acid-sensitive myeloid leukemia cells*. Leukemia 25:1914.

Silver R, Sookhoo AI, LeSauter J, Stevens P, Jansen HT, and Lehman MN (1999) *Multiple regulatory elements result in regional specificity in circadian rhythms of neuropeptide expression in mouse SCN*. Neuroreport 10(15):3165-3174.

Soler-Llavina GJ, Fuccillo MV, Ko J, Südhof TC, and Malenka RC (2011) *The neurexin ligands, neuroligins and leucine-rich repeat transmembrane proteins, perform convergent and divergent synaptic functions in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 108(40):16502–16509.

Song JY, Ichtchenko K, Südhof TC, and Brose N (1999) *Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses*. Proc Natl Acad Sci USA 96(3):1100-1105.

Spengler ML, Kuropatwinski KK, Schumer M, and Antoch M (2009) *A serine cluster mediates BMAL1-dependent CLOCK phosphorylation and degradation*. Cell Cycle 8(24):4138-4146.

Staab TA, Egratov O, Knowles JA, and Sieburth D (2014) *Regulation of synaptic nlg-1/neuroligin abundance by the skn-1/Nrf stress response pathway protects against oxidative stress*. PLoS Genet 10(1)e1004100.

Stambolic V and Woodgett JR (1994) *Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 β in intact cells via serine 9 phosphorylation*. Biochem J 303(3):701-704.

Stuchlik A (2014) *Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update*. Front Behav Neurosci 8:106.

Suzuki K, Hayashi Y, Nakahara S, Kumazaki H, Prox J, Horiuchi K, Zeng M, Tanimura S, Nishiyama Y, Osawa S, Sehara-Fujisawa A, Saftig P, Yokoshima S, Fukuyama T, Matsuki N, Koyama R, Tomita T, and Iwatsubo T (2012) *Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1*. Neuron 76(2):410-422.

Thotala DK and Yazlovitskaya EM (2011) *GSK3B (glycogen synthase kinase 3 beta)*. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol 15(1).

Tompkins OS (2011) *Circadian Rhythm Disruption*. AAOHN J 59(2):92.

Vallone D, Gondi SB, Whitmore D, and Foulkes NS (2004) *E-box function in a period gene repressed by light*. Proc Natl Acad Sci USA 101(12):4106-4111.

Varoqueaux F, Aramuni G, Rawson RL, Mohrmann R, Missler M, Gottmann K, Zhang W, Sudhof TC, and Brose N (2006) *Neuroligins determine synapse maturation and function*. Neuron 51(6):741-754.

Varoqueaux F, Jamain S, and Brose N (2004) *Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses*. Eur J Cell Biol 83(9):449-456.

Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW, and Takahashi JS (1994) *Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior*. Science 264(5159):719-725.

Wang H, Liu Y, Briesemann M, and Yan J (2010) *Computational analysis of gene regulation in animal sleep deprivation*. Physiol Genomics 42(3):427-436.

Wang Z, Wu Y, Li L, and Su XD (2013) *Intermolecular recognition revealed by the complex structure of human CLOCK-BMAL1 basic helix-loop-helix domains with E-box DNA*. Cell Res 23(2):213-224.

Weibel L and Brandenberger G (1998) *Disturbances in hormonal profiles of night workers during their usual sleep and work times*. J Biol Rhythms 13(3):202-208.

Weibel L, Spiegel K, Gronfier C, Follenius M, and Brandenberger G (1997) *Twenty-four-hour melatonin and core body temperature rhythms: their adaptation in night workers*. Am J Physiol 272(3):R948-R954.

Weitzman ED (1976) *Circadian rhythms and episodic hormone secretion in man*. Annu Rev Med 27(1):225-243.

Wittenmayer N, Körber C, Liu H, Kremer T, Varoqueaux F, Chapman ER, Brose N, Kuner T, and Dresbach T (2009) *Postsynaptic Neuroligin1 regulates presynaptic maturation*. Proc Natl Acad Sci USA 106(32):13564-13569.

Woodgett JR (1990) *Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A*. EMBO J 9(8):2431-2438.

Wright Jr KP, Hull JT, Hughes RJ, Ronda JM, and Czeisler CA (2006) *Sleep and wakefulness out of phase with internal biological time impairs learning in humans*. J Cogn Neurosci 18(4):508-521.

Xu H, Gustafson CL, Sammons PJ, Khan SK, Parsley NC, Ramanathan C, Lee HW, Liu AC, and Partch CL (2015) *Cryptochrome 1 regulates the circadian clock through dynamic interactions with the BMAL1 C terminus*. Nat Struct Mol Biol 22(6):476-484.

Yamato M, Ito T, Iwatani H, Imai E, and Rakugi H (2010) *E-cadherin and claudin-4 expression has circadian rhythm in adult rat kidney*. J Nephrol 23(1):102-110.

Yin L, Wang J, Klein PS, and Lazar MA (2006) *Nuclear receptor Rev-erba is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock*. Science 311(5763):1002-1005.

Yoo SH, Ko CH, Lowrey PL, Buhr ED, Song EJ, Chang S, Yoo OJ, Yamazaki S, Lee C, and Takahashi JS (2005) *A noncanonical E-box enhancer drives mouse Period2 circadian oscillations in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 102(7):2608–2613.

Annexe

Permission de reproduction de la figure 1 accordée par la revue scientifique PNAS :

Permission is granted for your use of the figure as described in your message. Please list a full citation for the PNAS article when re-using the material. Because this material published after 2008, a copyright note is not needed. There is no charge for this material, either. Let us know if you have any questions.

Best regards,
Kay McLaughlin for
Diane Sullenberger
Executive Editor
PNAS

Permission de reproduction de la figure 2 accordée par le journal scientifique Oxford University Press :

Thank you for your order.

This Agreement between Ms. Lydia Hannou ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

[printable details](#)

License Number	4293800428032
License date	Feb 21, 2018
Licensed Content Publisher	Oxford University Press
Licensed Content Publication	Human Molecular Genetics
Licensed Content Title	Molecular components of the mammalian circadian clock
Licensed Content Author	Ko, Caroline H.; Takahashi, Joseph S.
Licensed Content Date	Oct 15, 2006
Licensed Content Volume	15
Licensed Content Issue	suppl_2
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	Educational Institution/Non-commercial/ Not for-profit
Format	Electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your thesis / dissertation	La régulation transcriptionnelle de Neurologine-1 par les facteurs de transcription de l'horloge
Expected completion date	Mar 2018
Estimated size(pages)	135
Attachment	
Requestor Location	Ms. Lydia Hannou <div></div> Attn: Ms. Lydia Hannou
Publisher Tax ID	GB125506730
Billing Type	Invoice
Billing address	Ms. Lydia Hannou <div></div> Attn: Ms. Lydia Hannou
Total	0.00 CAD

[ORDER MORE](#)

[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2018 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL

1. Use of the material is restricted to the type of use specified in your order details.
2. This permission covers the use of the material in the English language in the following territory: world. If you have requested additional permission to translate this material, the terms and conditions of this reuse will be set out in clause 12.
3. This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.
4. No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission must be re-cleared with Oxford University Press if/when you decide to reprint.
5. The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being published on behalf of a learned society, the details of that society must be included in the credit line.
6. For the reproduction of a full article from an Oxford University Press journal for whatever purpose, the corresponding author of the material concerned should be informed of the proposed use. Contact details for the corresponding authors of all Oxford University Press journal contact can be found alongside either the abstract or full text of the article concerned, accessible from www.oxfordjournals.org Should there be a problem clearing these rights, please contact journals.permissions@oup.com
7. If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that any of the figures, images or photos was reproduced, drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to clear this permission with the original publisher as well. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photocopies.
8. While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Oxford University Press or by Copyright Clearance Center (CCC)) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked

and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Oxford University Press reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned or transferred by you to any other person without Oxford University Press's written permission.

10. Oxford University Press reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

11. You hereby indemnify and agree to hold harmless Oxford University Press and CCC, and their respective officers, directors, employs and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

12. Other Terms and Conditions:

v1.4